

Proteasen bei der Osteoarthrose:  
mRNA-Expression in Chondrozyten

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae**

**(Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von**

Christina Müller

**geboren am**

13.11.1982 in Jena

**Gutachter:** Prof. Dr. B. Wiederanders, Jena

Prof. Dr. R.-A. Venbrocks, Eisenberg

Prof. Dr. J. Grifka, Bad Abbach

**Tag der Verteidigung:** 08.01.2008

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Klinische Definition der Arthrose</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Epidemiologie</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Pathogenese</b>	<b>7</b>
<b>1.4 Histopathologie der Synovialitis</b>	<b>8</b>
<b>1.5 Die Synovialitis der Arthrose</b>	<b>9</b>
<b>1.6 Cathepsine</b>	<b>10</b>
1.6.1 Cathepsin B	12
1.6.2 Cathepsin H	13
1.6.3 Cathepsin K	13
1.6.4 Cathepsin L	14
<b>1.7 Endogene Inhibitoren von Cysteinproteasen</b>	<b>15</b>
<b>1.8 Matrixmetalloproteinasen</b>	<b>16</b>
1.8.1 Charakterisierung der Matrixmetalloproteinasen	16
1.8.2 Proteolytische Aktivität und Substratspezifitäten	18
1.8.3 Regulation der Expression	18
<b>1.9 Zusammenfassende Darstellung</b>	<b>19</b>
<b>2 Zielsetzung</b>	<b>19</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Material</b>	<b>20</b>
3.1.1 Allgemeine Laborgeräte	20
3.1.2 Plastikwaren	21
3.1.3 Glaswaren	22
3.1.4 Chemikalien	22
3.1.5 Chemikalien für Zellkultur, Medien und Zellkulturartikel	23
3.1.6 Puffer, Lösungen und Kulturmedien	24
3.1.7 Testkits	26
3.1.8 Molekulargewichtsmarker	26
3.1.9 Histologie	26

3.1.10	Software	27
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>28</b>
3.2.1	Zellbiologische Arbeiten	28
3.2.1.1	Knorpelpräparation	28
3.2.2	Molekularbiologische Arbeiten	29
3.2.2.1	Arbeiten mit RNA	29
3.2.2.2	RNA-Isolierung aus Kulturzellen	29
3.2.2.3	Spektrophotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren	30
3.2.2.4	Reverse-Transkription (cDNA-Synthese)	30
3.2.2.5	Quantitative Real-time PCR (qRT PCR)	31
3.2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese für DNA	36
3.2.3	Histologie	36
3.2.3.1	Anfertigen von Knorpelgefrierschnitten	36
3.2.3.2	Safranin-O-Färbung	37
3.2.3.3	Knorpelstatus und Osteoarthrosedokumentation (MANKIN-Score)	37
3.2.4	Statistik	39
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung des Patientenguts</b>	<b>40</b>
4.1.1	Röntgenologische Auffälligkeiten	44
<b>4.2</b>	<b>Analyse der mRNA-Expression in Chondrozyten bei Osteoarthrose</b>	<b>47</b>
4.2.1	RNA-Isolierung und RT-Schritt	47
4.2.2	Detektion der mRNA mittels qRT PCR	48
4.2.3	Auswertung der qRT PCR	51
4.2.3.1	Cathepsin B	52
4.2.3.2	Cathepsin H	53
4.2.3.3	Cathepsin K	54
4.2.3.4	Cathepsin L	55
4.2.3.5	Cystatin C	56
4.2.3.6	MMP 3	57
4.2.3.7	MMP 13	58
4.2.4	Kontrolle der PCR-Produkte	59
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>72</b>

<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>79</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>79</b>
<b>10</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>81</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>85</b>

# **1. Einleitung**

## **1.1 Klinische Definition der Arthrose**

Die Arthrose (syn. Arthrosis deformans, im englischen Sprachraum Osteoarthritis) ist eine degenerative Gelenkerkrankung, die jedes Gelenk betreffen kann. Sie geht mit Knorpelläsionen und schließlich mit einem Verlust des Knorpels einher [1, 2].

## **1.2 Epidemiologie**

Die Inzidenz und Prävalenz von Gon- oder Coxarthrose variieren je nach Studie erheblich. Die Inzidenz liegt zwischen 10 bis 2230 pro 10 Personen-Jahren, die Prävalenz wird auf 0,5 bis 36% eingeschätzt [3, 4]. Allgemein lässt sich jedoch sagen, dass bei Frauen über 50 Jahren das Risiko erhöht ist, an einer Arthrose zu erkranken. Außerdem ist bei Männern radiologisch häufiger eine Coxarthrose, bei Frauen hingegen eine Gonarthrose nachweisbar [5].

## **1.3 Pathogenese**

Die Pathogenese der Arthrose ist in ihrer Gesamtheit noch nicht geklärt. Es existieren zwei Pathogenesekonzepte nebeneinander [6]:

Im ersten, dem biochemischen Konzept, wird davon ausgegangen, dass durch einen unbekannten, vielleicht entzündlichen Reiz, es zu einer Destruktion von Knorpelmatrix kommt. Weil die Ursache für diese Reaktion unbekannt ist, bezeichnet man diese Arthrosen auch als idiopathische oder auch primäre Arthrosen [4, 5]. Aigner konnte nachweisen, dass in frühen Stadien eine hohe Fibronectinproduktion

stattfindet. Die Kollagentypen II und VI werden vermehrt gebildet und einzelne Metallproteinasen je nach Erkrankungsstadium ebenfalls [7]. Die Produktion von Proteinasen und Kollagen in phänotypisch veränderten Chondrozyten ist reaktiv erhöht [8].

Im zweiten, dem biomechanischen Konzept, wird davon ausgegangen, dass ein Missverhältnis zwischen Belastung und Belastbarkeit des Gelenkknorpels verantwortlich ist für die Entstehung der Erkrankung [9, 10]. Die hohe Belastung führt zu einem Proteoglykanverlust des Knorpels.

Bei beiden Konzepten kommt es zu einer Verminderung der Knorpel elastizität. Der Proteoglykanverlust bewirkt, dass weniger Wasser im Knorpel gebunden werden kann. Dies führt zu Belastungserscheinungen wie z.B. Defekten der kollagenen Fasern. Im weiteren Verlauf kommt es zum Knorpelverlust an den korrespondierenden Gelenkflächen und Rissen im Grenzbereich zwischen nicht verkalktem und verkalktem Knorpel [11]. Es kommt zur Destruktion von Knorpel- und Knochenstrukturen. Im Rahmen dieser degenerativen Prozesse werden weitere Prozesse angestoßen: Bildung von Osteophyten, Pseudarthrosen [12] und eine – im Vergleich zur rheumatischen Arthritis – eher geringgradige entzündliche Reaktion der Synovialmembran [13], die sogenannte Synovialitis.

## **1.4 Histopathologie der Synovialitis**

Die Synovialitiden der Gelenke können unterschiedliche Ursachen haben. Je nach Ursache entwickelt sich daraus ein charakteristisches histopathologisches Bild [6]. Bei der bakteriellen Infektion kommt es zu einer akuten Reaktion mit granulozytärer Infiltration, ödematöser Schwellung, Gelenkerguß und evtl. Fibrinablagerungen. Bei den Kristallarthritis findet man außerdem noch Fremdkörperriesenzellen und aktivierte Fibroblasten [5]. Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine Autoimmunreaktion, die sich in Form einer heftigen Entzündungsreaktion mit Infiltration des Gelenkes durch Lymphozyten und Makrophagen manifestiert. In Abhängigkeit von der



Erkrankungsdauer zeichnet sich die Synovialitis der RA durch ein dichtes, zum Teil lymphofollikulär organisiertes entzündliches Infiltrat mit beträchtlich aktivierter Deckzellschicht, neutrophilen Granulozyten, Mastzellen und aktivierten synovialen Fibroblasten/Makrophagen sowie Granulomen aus [14]. Krenn zeigte, dass bei der entzündlichen Reaktion der RA eine B-Lymphozyten-Reifung in Keimzentren vergleichbaren lymphofollikulären Aggregaten stattfindet [13].

## **1.5 Die Synovialitis der Arthrose**

Aufgrund der Pathogenese ist die Synovialitis der Arthrose als eine sekundäre und reaktive Entzündung der Synovialmembran zu betrachten, da zunächst ein Abbau von Knorpelfragmenten besteht [15]. Diese Fragmente aus degeneriertem Gelenkknorpel gelangen in die Membrana synovialis und führen dort im Rahmen des Abbaus zu einer entzündlichen Reaktion [16].

In verschiedenen Arbeiten wurde die Morphologie des entzündlichen Infiltrates bereits charakterisiert [17]. Dabei werden zwei Unterformen aufgrund ihrer dominierenden Komponente unterschieden.

Die eine Unterform zeigt histologisch eine geringgradige Verbreiterung der synovialen Deckzellschicht und Bindegewebszunahme vorrangig in der Nähe von Knorpelfragmenten. Die Knorpelfragmente, die vom Gelenkknorpel stammen, geben dieser Form den Namen Detritussynovialitis.

Die andere Unterform weist vor allem perivaskulär gelegene leichte, lymphozytäre und plasmazelluläre Infiltrationen auf [18-21]. Diese sind charakteristisch für die Lymphoplasmazelluläre Synovialitis. Verglichen mit der rheumatoiden Arthritis liegen geringgradige lymphozytäre Infiltrationen vor, die als B-Lymphozyten sowie CD 4+ und CD 8+ T-Lymphozyten identifiziert wurden [19].

## 1.6 Cathepsine

Proteasen sind dazu in der Lage, die Hydrolyse von Amidbindungen zu katalysieren. Demzufolge sind sie an Prozessen wie Koagulation (Gerinnung), Verdauung, Reifung von Zytokinen und Prohormonen, Apoptose und Degradation von intrazellulären Proteinen beteiligt [22].

Es gibt fünf Hauptklassen proteolytischer Enzyme. Unterschieden werden anhand des bedeutenden Restes am aktiven Zentrum Aspartat-, Cystein-, Serin-, Threonin- und Metalloproteinasen. Zu den Cysteinproteasen gehört eine große Gruppe von Enzymen, die von Rawlings & Barrett in Clans und Familien klassifiziert wurden [23]. Eine Familie umfasst die Enzyme, die eine evolutionäre Beziehung untereinander haben. Ein Clan setzt sich aus Gruppen von Familien mit einer Beziehung zueinander zusammen. Die größte Familie der Cysteinproteasen ist die Papain-Superfamilie [24]. Papain-ähnliche Cysteinproteasen von Säugern sorgen zum Einen für die lysosomale Proteindegradation, sind aber auch in der extrazellulären Matrix vorhanden [25]. Obwohl unter den Cathepsinen auch andere Proteasen, wie Cathepsin G (Serinprotease) und Cathepsin D (Aspartatprotease), vorkommen, sind die meisten der Cathepsine Cysteinproteasen. Daher wird die Bezeichnung „Cathepsin“ häufig als allgemeiner Begriff für lysosomale Cysteinproteasen verwendet. Das Wort Cathepsin stammt aus dem Griechischen und bedeutet so viel wie „verdauen“ [26].

Untersuchungen ergaben, dass neben dem allgemeinen Proteinabbau auch limitierte proteolytische Prozesse durch diese Enzyme katalysiert werden, z.B. Antigenpräsentation [27], Knochenabbau [28] und Prohormonaktivierung [29]. Außerdem soll eine erhöhte Aktivität von Cathepsinen auch an verschiedenen Krankheitsprozessen beteiligt sein, z.B. Lungenemphysem [30], Osteoporose [31], Alzheimer Krankheit [32], rheumatische Arthritis [33], Metastasen und Krebs [34]. Deshalb könnte die Entwicklung von Inhibitoren der Cathepsine für die Zukunft eine Möglichkeit in der Therapeutikaentwicklung darstellen.

Die Cathepsine werden zunächst an membrangebundenen Ribosomen als Vorstufen synthetisiert und in das Endoplasmatische Retikulum überführt. Im Golgi-Apparat kommt es zur Glykosylierung und Phosphorylierung des terminalen Mannose-6-phosphat-Restes, der das Protein in die endosomalen Kompartimente transportiert hat und für die Lenkung des Proteins zu den Lysosomen verantwortlich ist. Auf dem Weg durch das endosomale Kompartiment bis zu den Lysosomen werden die Cathepsinvorstufen mit steigender Ansäuerung des Milieus durch autolytische und proteolytische Vorgänge zu den aktiven Formen gespalten. Die reifen Enzyme bestehen aus zwei Domänen, die durch eine V-förmige Spalte voneinander getrennt sind. In der Mitte dieser Spalte befinden sich die Aminosäuren Cystein, Histidin und Asparagin, die das katalytisch aktive Zentrum bilden [35]. Die Bildung eines Thiolatanions ist essentiell für die Katalyse. Sie ist abhängig von der Ionenpaarbindung zwischen dem Cystein des aktiven Zentrums und der benachbarten Aminosäure Histidin [36].

Die Konzentration an Lysosomen und den darin enthaltenen Proteasen ist von Zelle zu Zelle sehr unterschiedlich. Besonders hoch ist sie in Leber, Milz, Niere und Makrophagen.

Die Papain-ähnlichen Cysteinproteasen liegen als Präproenzyme vor und werden erst in Proenzyme umgewandelt. Die Propeptidanteile davon wirken als potenter, pH-abhängiger Inhibitor der Cathepsine und sind essentiell für die korrekte Faltung und Stabilisierung von Cysteinproteasen [37-39]. Die Abspaltung des Propeptides und Aktivierung des Enzyms erfolgen durch Autokatalyse unter sauren Bedingungen [39]. In vitro können aber auch Cathepsin D, Pepsin, Serinproteasen, Metalloproteasen sowie Cysteinproteasen die Propeptidabspaltung katalysieren [40].

In der Regel funktionieren die Cathepsine als Endopeptidasen. Jedoch wurde für Cathepsin B zusätzlich die Fähigkeit, als Dipeptidylcarboxypeptidase und für Cathepsin H die Fähigkeit, als Aminopeptidase zu wirken, nachgewiesen [41].

Die Papain-Superfamilie C1 zählt insgesamt 11 Mitglieder. Dazu gehören Cathepsin B [42], C [43, 44] F [45, 46], L [47, 48], H [49, 50], K [51, 52], O [53], S [43, 54], V [55], W [56] und X [57]. Einige zeigen ein selektives (Cathepsin S) [58] bzw. spezifisches (Cathepsin K) [28] Zellvorkommen. Sequenzanalysen und

Strukturcharakteristika ermöglichten die Einteilung in 2 Unterfamilien [59]. Die Cathepsine F, H, K, L, O, S, V und W gehören zur größeren Cathepsin L-Unterfamilie. Die Cathepsine B, C und X bilden die Cathepsin B-Unterfamilie. Gravierende Unterschiede dieser beiden Unterfamilien gibt es in der Sequenz und der Länge der jeweiligen Proregionen. Die Proregionen der Cathepsin B-ähnlichen Enzyme bestehen aus ca. 60 Aminosäuren, die der Cathepsin L-ähnlichen Proteasen umfassen ca. 100 Aminosäuren [60].

Das Molekulargewicht der lysosomalen Proteinasen ist mit 20000 bis 40000 Dalton eher klein. Die optimale Aktivität der Enzyme liegt im sauren pH-Bereich, im neutralen und basischen Milieu sind sie instabil.

Die Hauptfunktion der lysosomalen Cysteinproteasen besteht im Abbau von Proteinen. In den Lysosomen werden die Proteine vollständig zu Dipeptiden und Aminosäuren degradiert und durchdringen als solche die Lysosomenmembran um erneut für die Proteinsynthese zur Verfügung zu stehen [40, 61, 62].

### **1.6.1 Cathepsin B**

Cathepsin B ist eine der am meisten untersuchten lysosomalen Cysteinproteasen. Man findet es in nahezu allen Organen und Geweben aller Säugetiere. Die sekretierten Formen sind stets Proenzyme. Die Präproform des humanen Cathepsin B besteht aus 339 Aminosäuren mit einer Molmasse von 39 kDa. Das Propeptid von Cathepsin B ist in leicht saurem Milieu (pH 6.0) ein potenter langsam bindender Inhibitor für dieses Enzym [37]. Das katalytisch aktive Cathepsin B wird von speziellen Zellen und Zellkulturen bei einem pH-Wert unter 7.0 freigesetzt und besteht aus 254 Aminosäuren. Im Gegensatz zu anderen Papain-ähnlichen Cathepsinen kann es als Exo- und Endopeptidase wirken [62]. Mit einer breiten Substratspezifität spaltet Cathepsin B zahlreiche synthetische Substrate bei einem pH-Wert von 5-6 [40]. Neben der Hydrolyse von Peptidsubstraten besitzt es aber auch die Fähigkeit, Dipeptideinheiten vom C-Terminus abzuspalten (Dipeptidylpeptidaseaktivität) [25]. Die Hauptfunktion liegt somit in der Aktivierung

und Inaktivierung von Gewebeproteinen. Cathepsin B besitzt in vitro kollagenolytische Aktivität.

### **1.6.2 Cathepsin H**

Cathepsin H zeigt eine hohe Verwandtschaft zu Cathepsin L und S, aber auch zu Proteasen, die in Schimmelpilz-Zellen vorkommen [40]. Die Präproform dieses Enzyms besteht aus 335 Aminosäuren und hat eine Molmasse von 41 kDa. Die reife Enzymform hat ihr pH-Wirkungsoptimum im Bereich von 6.5-6.8 und wird bei einem pH-Wert über 7 irreversibel inaktiv [40]. Fruton et al. untersuchten die Aminopeptidaseaktivität von Cathepsin H und bezeichneten es als thiolabhängige „Leucinaminopeptidase“ [63]. Kirschke et al. beschrieben dieses Protein als „Endoaminopeptidase“, da es in der Lage ist, sowohl als Aminopeptidase als auch als Endopeptidase Substrate zu hydrolysieren [41]. Spezifische Substrate sind N-terminal ungeschützte Derivate [40]. Ein Fragment des Cathepsin H-Propeptides, die sogenannte Minikette, bindet in das katalytisch aktive Zentrum und sorgt für die Aminopeptidaseaktivität [64, 65]. Denn, wie Guncar et al. zeigten, wird diese Minikette aus acht Aminosäuren (Glu-Pro-Gln-Asn-Cys-Ser-Ala-Thr) über eine Disulfidbrücke an das Enzym gebunden, so dass der negativ geladene C-Terminus des Oktapeptids mit dem positiv geladenen N-Terminus eines Substrates interagieren kann [65]. Es können so durch Cathepsin H auch Substrate mit blockierter  $\alpha$ -Aminogruppe hydrolysiert werden [41, 66].

### **1.6.3 Cathepsin K**

Das osteoklastenspezifische Cathepsin K kommt im Vergleich zu den anderen Cyteinproteasen am häufigsten in diesen Zellen [67] vor und ist wahrscheinlich entscheidend an der Knochenresorption beteiligt. Die an der Knochenoberfläche anhaftenden Osteoklasten sorgen für die Bildung einer extrazellulären Resorptionslakune, in welche die Osteoklasten die proteolytischen Enzyme

absondern. In saurem Milieu wird nun die Mineralschicht in diesem Bereich zerstört und es kommt zur Degradation der Proteinmatrix durch proteolytische Enzyme [68].

Cathepsin K weist gegenüber den Kollagentypen I, II und IV eine hohe hydrolytische Aktivität auf und zeigt ebenso eine starke gelatinolytische Aktivität [69]. Es ist das einzige Enzym bei Säugern, das aus Kollagen kleine Peptidfragmente bildet. Seine Wirkung ist jedoch stark abhängig von der Anwesenheit saurer Glykosaminoglykane. Außerdem ist Cathepsin K bei Kollagen-induzierter Arthritis erhöht. Mutationen, die ein nichtfunktionelles Enzym hervorrufen, sind verantwortlich für eine seltene Erbkrankheit, die Pycnodysostose [68, 70]. Dabei kommt es zu verschiedenen Defekten im Knochen-Remodeling, die zu Frakturen im Kindesalter und zur Knochensklerose im Erwachsenenalter führen.

Die Expression von Cathepsin K in Bronchialepithelzellen und embryonalen Lungengewebe sind mehrfach beschrieben [71, 72].

Nach Umwandlung des inaktiven Präproenzym in die Proform, wird durch proteolytische Abspaltung des aus 99 Aminosäuren bestehenden Propeptides die reife Form synthetisiert. In vitro erfolgt dieser Prozess autokatalytisch bei einem pH-Wert von 4.0 [73]. In der Umgebung des Knochenresorptionsloches liegt ebenfalls ein niedriger pH-Wert vor, so dass hier die Aktivierung von Procathepsin K in vivo möglich ist [74].

Die Präproform mit 329 Aminosäuren hat eine Molmasse von 37 kDa. Die reife Form besteht aus 215 Aminosäuren. Das pH-Optimum zur Hydrolyse liegt zwischen 6.0 und 6.5 [68].

#### **1.6.4 Cathepsin L**

Cathepsin L ist unter den lysosomalen Cysteinproteasen die mit der höchsten hydrolytischen Aktivität gegenüber den Proteinen Azocasein, Elastin und Kollagen [30, 66, 75]. Es dient der Proteindegredation [76], der Aktivierung des Proplasminogenaktivators [40] und ist beteiligt an der Knochenresorption [77], der Myelindegeneration [78] und der Tumormetastasierung [79]. Die Präproform mit 333

Aminosäuren hat eine Molmasse von 38 kDa. Procathepsin L ist instabil bei neutralem bzw. basischem pH-Wert [38]. Das Propeptid mit 96 Aminosäuren ist zwischen der Signalsequenz und dem N-Terminus des reifen Enzyms lokalisiert. Die reife Form aus 220 Aminosäuren ist bei pH-Werten zwischen 3.0 und 6.5 katalytisch aktiv. Aufgrund seiner begrenzten Spezifität spaltet Cathepsin L bevorzugt Substrate mit Arginin in P1-Position und hydrophoben Resten in P2- und P3-Position bei einem pH-Wert von 5.5 [40].

Alle vier Cathepsine sind also an der Resorption der Knochenmatrix beteiligt. Sie sind somit interessante Zielmoleküle, um Wirkstoffe zu entwickeln, die ihre Aktivität beeinflussen und in der Therapie arthrotischer Erkrankungen eine Rolle spielen könnten.

## **1.7 Endogene Inhibitoren von Cysteinproteasen**

Um eine unangemessene Proteolyse zu verhindern kontrollieren u.a. endogene Protease-Inhibitoren die Aktivität der Cysteinproteasen. Intralysosomale Inhibitoren wurden bisher noch nicht entdeckt, jedoch schützt eine große Menge dieser Inhibitoren im Cytosol die Zelle vor dem Selbstverdau [80]. Die Inhibitoren kommen auch extrazellulär, z.B. im Plasma und im Urin, vor [81]. Zu den physiologischen Inhibitoren gehören Kininogene und Cystatine [82]. Cystatine sind einkettige Polypeptide und werden in zwei Familien untergliedert. Zur Familie 1 zählen Cystatin A und B, die auch als Stefine bezeichnet werden und eine Molekülmasse von 11-12 kDa aufweisen. Der Familie 2 zugehörig sind die Cystatine C, D, S, SN und SA. Cystatin C ist mit seinem Vorkommen in allen Körperflüssigkeiten der am weitesten verbreitete Inhibitor der Cysteinproteasen [83].

## 1.8 Matrixmetalloproteinasen

### 1.8.1 Charakterisierung der Matrixmetalloproteinasen

Von den zinkabhängigen Matrixmetalloproteinasen (MMPs) gibt es mindestens 24 [84, 85]. Sie werden als Zymogene (Pro-MMPs) sezerniert und extrazellulär stufenweise durch proteolytische Spaltungen und Konformationsänderungen aktiviert. Infolge ihrer Fähigkeit zur Matrix-Degradierung führen sie zum Gewebeumbau, sowohl im physiologischen als auch im pathologischen Sinne.

Charakteristische Merkmale der Matrixmetalloproteinasen sind folgende [86]:

Die Proteaseaktivität wird durch 1,10-Phenanthrolin, spezifische tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs),  $\alpha_2$ -Makroglobulin und Ovostatin gehemmt. Die Cysteinproteasen hydrolysieren mindestens eine Komponente der extrazellulären Matrix. Ein Calcium-Ion sorgt für die Enzymstabilität und ein Zink-Ion im aktiven Zentrum gewährleistet die Aktivität des Enzyms. Unter physiologischen Bedingungen sind im Gewebe jedoch nur geringe Konzentrationen von MMPs vorzufinden (1-10µg/mg Gewebe) [86].

Aufgrund der Substratspezifität unterteilte Cawston 1998 die Matrixmetalloproteinasen in 6 Gruppen [87]:

Kollagenasen (Typ I-Kollagenasen)

Gelatinasen (Typ IV-Kollagenasen)

Stromelysine

Membranständige MMPs

Matrilysine

Nicht klassifizierbare MMPs



Da in dieser Arbeit nur die MMPs 3 und 13 betrachtet wurden, soll nachfolgend nur auf diese im Detail eingegangen werden.

Stromelysine wie MMP-3 haben das größte Substratspektrum. Eine Vielzahl von Matrixproteinen, wie Proteoglykane, Glykoproteine, Gelatine, Elastine und Typ III-, IV- und V-Kollagen wird durch sie abgebaut [88]. MMP-3 sorgt aber auch für die Hydrolyse von Typ II-, IX-, X- und XI-Kollagen [89].

Die Kollagenasen, zu denen MMP-13 zählt, sind als einzige dazu fähig, natives interstitielles Kollagen (Typ I, II, III) zu spalten. Die Tripelhelix wird in ein  $\frac{1}{4}$  - und ein  $\frac{3}{4}$  -Fragment zerlegt und kann danach durch andere Enzyme weiter abgebaut werden [90, 91].

Matrixmetalloproteinasen bestehen aus 3 Domänen, dem aminoterminalen Propeptid, der katalytischen Domäne und einer Hemopexin-ähnlichen Domäne am Carboxylende [92].

Das Propeptid aus 80-90 Aminosäuren interagiert über einen Cysteinrest mit dem katalytischen Zinkatom. Die proteolytische Propeptidabspaltung ist für die MMP-Aktivierung unbedingt notwendig [93].

Zwei Zink-Ionen enthält die katalytische Domäne (ca. 170 Aminosäuren). Davon befindet sich eins im aktiven Zentrum und das zweite sorgt mit zwei bis drei Calciumionen für die Stabilität des Enzyms [94].

Die C-terminale Hemopexin-ähnliche Domäne mit ca. 210 Aminosäuren spielt eine Rolle bei der Substratbindung und der Interaktion mit spezifischen Inhibitoren (TIMPs) [95]. Außerdem benötigen die Kollagenasen sie zur Bindung und Spaltung von interstitiellem Kollagen [96].

### **1.8.2 Proteolytische Aktivität und Substratspezifitäten**

Durch ihre Bindegewebs- und Basalmembran-degradierenden Eigenschaften sind die MMPs an zahlreichen physiologischen Vorgängen, wie Zellmigration [97, 98], Embryogenese [99, 100], Wundheilung [101] und dem ovariellen und endometrialen Zyklus [102] beteiligt. Sie spielen aber auch eine große Rolle bei vielen pathologischen Prozessen, z.B. Tumorerkrankungen, insbesondere Metastasierung [103-105], Kornea- und Magenulzera sowie Kollagenosen, wie Arthritis und Fibrose von Niere und Leber [106-108].

Anhand dieser Merkmale wird deutlich, dass auch die Matrixmetalloproteinasen zur Knorpel- und Knochendestruktion beisteuern und die Untersuchung ihrer Expression in osteoarthrotischem Knorpel von großem Interesse ist.

### **1.8.3 Regulation der Expression**

Zu den die Expression verstärkenden Faktoren gehören z.B. Cytokine und Wachstumsfaktoren (EGF, Interferone, IL-1 $\alpha$  und  $\beta$ , IL-6, PDGF und TNF- $\alpha$ ), Chemikalien (Lipopolysaccharide, Prostaglandin E), physikalische Einflüsse (Hitze und UV-Irritation) und Zelloberflächen-wirkende Einflüsse (Zellfusion, Phagozytose, Kollagene). Diese Faktoren spielen auch bei der Arthrose eine große Rolle, so dass sie zu einer Überexpression der MMPs führen können.

Zu den die Expression verringernden Faktoren zählen Retinoide, Glukokortikoide, Östrogen, Progesteron und TGF- $\beta$ , wobei für TGF- $\beta$  sowohl eine suppressive als auch eine steigernde Wirkung in Fibroblasten und Keratinozyten bewiesen ist.

## **1.9 Zusammenfassende Darstellung**

Aufgrund von Verschleiß und Zerstörung des Kniegelenks werden bei vielen Patienten Totalendoprothesen eingesetzt. Festgestellt wurde jedoch, dass Cathepsine und MMPs, die vom Körper selbst produziert werden, bei dem Knorpelabbau eine entscheidende Rolle spielen. Somit könnte die Verringerung ihrer Bildung bzw. die Steigerung der Bildung von Inhibitoren in der Arthrosebehandlung zukünftig von großer Bedeutung sein und die Notwendigkeit von Kunstgelenken reduzieren.

## **2 Zielsetzung**

Lysosomale Cysteinproteasen sind mitverantwortlich für den Umbau intra- und extrazellulärer Proteine. Sie sind beteiligt an pathologischen Prozessen, die zum Gewebeabbau führen. Daher ist es von großem Interesse, die RNA-Expression und Aktivität dieser Proteasen im geschädigten Gewebe zu analysieren. Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Cathepsin- und MMP-Expression bei Patienten mit Osteoarthritis im Kniegelenk. Dazu wurde Knorpel von Patienten mit einem Alter zwischen 45 und 84 Jahren genutzt, sodass fortgeschrittene osteoarthrotische Veränderungen anzunehmen sind. Mit diesem Material wurde die spezifische Expression der Cathepsine B, H, K, L, der MMPs 3 und 13 sowie von Cystatin C mittels Real-Time-PCR bestimmt.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Allgemeine Laborgeräte

Analysenwaage (geschlossen) BP 121S	Sartorius
Analysenwaage (offen) GS	Kern
Autoklav	Getinge
BioDocAnalyze	Biometra
Brutschrank INCO 2	Memmert
Digitalkamera AxioCam	Zeiss
Eismaschine AF80	Scotsman® Frimont
Fluor S™-Multimager	Bio-Rad
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr
Gefriertruhe (-80°C)	Nunc
Gelapparatur MINI-SUB®CELL GT	Bio-Rad
Heizblock ThermoStatplus	Eppendorf
Kryostat CM 1100	Leica
LAB Reinstwassersystem	TKA
Magnetrührer VARIOMAG COMPACT HP1	H+P Labortechnik
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss
Mikrowelle	Daewoo

MyiQ single colour	
Real-time PCR detection system	Bio-Rad
Netzgerät POWER PAC 300	Bio-Rad
PCR-Maschine Mastercycler gradient	Eppendorf
pH-Meter HI 8014	HANNA instruments
Pipetten Research	Eppendorf
Pipetus®-standard	Hirschmann
Schüttler Unimax 1010	Heidolph Industries
Spektrophotometer SmartSpec™ 3000	Bio-Rad
Sterile Werkbank Mikroflow Mikrosafe SC	Nunc
Tischautoklav	CertoClav
Vakuumpumpe Atmoport	Atmos
Vortexer Vortex-Genie 2®	Scientific Industries
Wasserbad	Memmert
Zentrifugen 5810 R, 5804 R	Eppendorf

### **3.1.2 Plastikwaren**

Parafilm M	American National Can™
PCR-Tubes	Eppendorf, Bio-Rad
Petrischalen	BD Falcon™
Pipettenspitzen	Eppendorf
Reaktionsgefäße	Eppendorf

### 3.1.3 Glaswaren

Objektträger Super Frost® Plus	Menzel-Gläser
Deckgläser 24x50mm	Menzel-Gläser

### 3.1.4 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht anders vermerkt, in p.A. Qualität bezogen.

Agarose	Bio-Rad
Borsäure	MERCK
Chloroform	MERCK
EDTA	MERCK
Ethanol	MERCK
Ethidiumbromid	Roth
Glycerin	MERCK
HCl	MERCK
Isopropanol	MERCK
KCl	MERCK
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MERCK
Kupfersulfat	MERCK
β-Mercaptoethanol	MERCK
Na <sub>2</sub> EDTA	MERCK
NaCl	MERCK
NaHCO <sub>3</sub>	MERCK

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MERCK
NaOH	MERCK
Orange G	Sigma
Tissue-Tek <sup>®</sup>	O.C.T. <sup>™</sup> Compound
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	MERCK

### 3.1.5 Chemikalien für Zellkultur, Medien und Zellkulturartikel

Kollagenase P	Roche
DMEM	Sigma
Dreihalsgefäß mit Magnetrührer	Wheaton
Ethanol (70-, 96-, 100%ig)	Dr. K. Hollborn & Söhne
Fötales Kälberserum (FKS)	Invitrogen Life Technologies
Gentamycin	Sigma
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Roth
Pronase E	Merck
Sterilfilter FP 30/0,2 CA-S	Schleicher & Schuell
Steril-Skalpelle	Aesculap <sup>®</sup>
Trizol	Invitrogen Life Technologies
Zellkulturartikel	BD Falcon <sup>™</sup>
Zellsieb 100µm	BD Falcon <sup>™</sup>

### 3.1.6 Puffer, Lösungen und Kulturmedien

Für gebräuchliche molekularbiologische Techniken wurden, sofern nicht extra erwähnt, Puffer und Lösungen nach Standardprotokollen hergestellt. Hierfür wurde nur destilliertes Wasser verwendet.

TBE-Puffer (5x):	0,5 M Tris 0,5 M Borsäure 10 mM Na <sub>2</sub> EDTA mit Reinst-H <sub>2</sub> O auffüllen
Probenpuffer 1 (6xLoading Puffer):	1% Orange G 25 mM EDTA 50% Glycerin
Probenpuffer 2 (10xLoading Puffer):	4,0 mg Bromphenol-Blau 0,5 ml Glycerol 0,5 ml 1xTBE-Puffer 0,5 µl EthBr (aus Stock 10 mg/ml)
Elektrophorese-Puffer:	300 ml 1xTBE + 15 µl EthBr
Ethidiumbromid-Stammlösung (EthBr):	10mg/ml



## PBS

10,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

2,7 mM KCl

137 mM NaCl

800 ml Reinst- $\text{H}_2\text{O}$

pH-Einstellung mit

5N NaOH auf 7,4

mit Reinst- $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 l

auffüllen

autoklavieren

## DMEM

13,42 g/l Trockenpulver

44 mM  $\text{NaHCO}_3$

800 ml Reinst- $\text{H}_2\text{O}$

pH-Einstellung mit

4M HCl auf 7,4

mit Reinst- $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 l

auffüllen

## Pronaselösung

1 mg/ml Pronase E

serumfreies DMEM

sterilfiltrieren

Kollagenaselösung	0,1 mg/ml Kollagenase P serumhaltiges DMEM sterilfiltrieren
-------------------	---

serumhaltiges Medium	DMEM 50µg/ml Gentamycin 5% FKS
----------------------	--------------------------------------

### 3.1.7 Testkits

Omniscript® Reverse Transcription	Qiagen
SYBR Green iQ Supermix	Bio-Rad
Taq-PCR MasterMix	Qiagen

### 3.1.8 Molekulargewichtsmarker

100 Bp-DNA Leiter (equalized)	Roth
-------------------------------	------

### 3.1.9 Histologie

DRX Mountant for histology	Fluka BioChemika
Goldner-Lösung III (Lichtgrün)	Dr. K. Hollborn & Söhne
Safraninlösung (1% wässrig)	Dr. K. Hollborn & Söhne
Xylol	Dr. K. Hollborn & Söhne

### **3.1.10 Software**

Microsoft Office 2000

Microsoft

Photoshop Version 5.5

Adobe

Quantity One

Biorad

Sigma Plot Version 8.0

SPSS

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellbiologische Arbeiten**

#### **3.2.1.1 Knorpelpräparation**

Zur Verfügung stand humanes Knorpelmaterial von Kniotalendoprotheseoperationen, welches unmittelbar nach der operativen Entfernung steril verpackt abgeholt wurde. Aufgrund guter Zusammenarbeit mit der Orthopädischen Klinik der Universität Jena in Eisenberg war eine unverzügliche Materialverarbeitung gewährleistet. Eine Patienteneinverständniserklärung wurde jeweils eingeholt und die Genehmigung der Ethik-Kommission für Untersuchungen zum Proteinstoffwechsel von menschlichen Chondrozyten lag vor (Bearbeitungsnummer: 1772-04/06)

Das mit Skalpell steril abgetragene Knorpelmaterial von Femur und Tibia wurde in eine mit DMEM gefüllte Kunststoffpetrischale (Greiner) gegeben. Es wurde nur makroskopisch normal aussehender Knorpel verwendet. Das Nassgewicht des geernteten Knorpels wurde ermittelt. Daraus konnte eine Prognose auf die zu erwartende Zellausbeute getroffen werden (1 g Knorpel enthielt ~10 Millionen Zellen). Unter der sterilen Werkbank wurden die Knorpelstücke in das Verdaugefäß überführt und nach Aydelotte und Kuettner verarbeitet[109].

Im ersten Verdauschritt wurde für eine Stunde Pronase (1mg/ml) in serumfreiem DMEM hinzugegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (37°C) folgte der zweite Verdauschritt. Dazu wurde für 17 Stunden Kollagenase P(0.1 mg/ml) in DMEM mit 5 % FKS hinzugegeben. Für beide Verdauschritte wurde das Verdaugefäß in den Brutschrank auf einen Magnetrührer gestellt.

Nach der Zentrifugation (1500 rpm, 5 min, 25°C) in einem 50 ml Reaktionsgefäß wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das Pellet wurde dreimal mit PBS (37°C) gewaschen und nochmals bei 1 500 rpm für 5 min zu zentrifugiert. Der Überstand

wurde wiederum vorsichtig abgesaugt und in serumhaltiges DMEM mit der Pipette resuspendiert. Üblicherweise wurden 20 ml Medium mit 5 % FKS benötigt. Die Zellen wurden anschließend in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gezählt. Pro 1 ml 5% FKS-haltigem DMEM wurden 1 Million Chondrozyten aufgenommen und in einer Zelldichte von 100 000 Zellen je Vertiefung in eine 96-Loch-Platte ausgesät. Nach einer Adhärenzzeit von 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 1 Million Chondrozyten/ml in Trizol aufgenommen. Das Adhärenzverhalten der Zellen wurde abgewartet, da parallel mit einem Fluoreszenzassay die Enzymaktivität bestimmt wurde.

### **3.2.2 Molekularbiologische Arbeiten**

#### **3.2.2.1 Arbeiten mit RNA**

Beim Arbeiten mit RNA ist es auf Grund des ubiquitären Auftretens von RNasen notwendig, Vorkehrungen zu treffen, die RNase-freies Arbeiten gewährleisten. Daher wurden sämtliche Arbeitsschritte mit sterilen, autoklavierten Einmalgeräten bzw. hitzesterilisierten Glaswaren durchgeführt.

#### **3.2.2.2 RNA-Isolierung aus Kulturzellen**

Die Isolierung der RNA erfolgte nach der TRIzol™-Methode. Die bei –20°C gelagerte Probe wurde auf Eis aufgetaut und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro ml Trizol wurde das Zell-Lysat 15 sec geschüttelt und nach 2-3 min Inkubation bei Raumtemperatur 15 min bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die RNA befand sich nun in der oberen wässrigen Phase, die in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Durch das Zugabe von 0,5 ml Isopropanol pro ml Trizol wurde die RNA gefällt. Nach einer 10 minütigen Inkubation wurde anschließend 10 min zentrifugiert (12000 g, 4°C). Am Gefäßboden wurde ein Pellet sichtbar. Der Überstand musste nun vorsichtig abpipettiert werden. Um das Pellet zu

waschen wurde 1 ml 75%iges EtOH pro ml Trizol hinzugegeben. Nach der Zentrifugation (5 min, 7500 g, 4°C) und dem Abpipettieren des Überstandes wurde das RNA-Pellet 5-10 min unter dem Abzug getrocknet. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Pellet nicht vollständig austrocknet. Nun wurde das Pellet in 25 µl RNase freies Wasser aufgenommen. Durch die folgende Inkubation (10 min, 55°C) wurde die RNA denaturiert. Die Probe musste danach sofort auf Eis gelagert werden.

### **3.2.2.3 Spektrophotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren**

Mittels Konzentrationsbestimmung konnte ermittelt werden, ob genügend RNA für die Analyse der mRNA-Expression isoliert wurde.

Zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der wässrigen RNA-Lösung wurde die Absorption in Quarzküvetten spektrophotometrisch gemessen. Die Absorption musste mit der Verdünnung (1:50) und dem Extinktionskoeffizienten multipliziert werden, um die Konzentration der RNA (in µg/ml) zu erhalten. Der Blank-Wert enthielt nur destilliertes Wasser.

Zur Sicherstellung der Qualität der isolierten Total-RNA wurde der Absorptionsquotient bestimmt. Das Verhältnis  $A_{260}$  zu  $A_{280}$  lässt auf die Reinheit der Total-RNA schließen und sollte zwischen 1,9 und 2,3 liegen. Ein kleineres Verhältnis weist auf Verunreinigungen mit Proteinen bzw. Salzurückständen hin. In dieser Arbeit wurden nur Proben mit einem Zahlenwert zwischen 1,9 – 2,3 verwendet.

### **3.2.2.4 Reverse-Transkription (cDNA-Synthese)**

Weil die bei der quantitativen real-time PCR verwendete Taq-DNA-Polymerase die RNA nicht als Vorlage (Template) erkennt, wurde nach Gewinnung der mRNA, diese in cDNA umgeschrieben. Mittels Oligo(dT) Primer und der reversen Transkriptase wurde zu der mRNA ein komplementärer DNA-Strang (cDNA) gebildet, welcher dann als Template in der PCR diente.

Zur Umwandlung der RNA in cDNA wurde der Omniscript RT Kit nach Herstellerangaben verwendet. Laut dieser Angaben wurde darauf geachtet, dass nicht mehr als 4 µg RNA pro Ansatz verwendet wurden.

Als Ansatz wurde folgendes zusammenpipettiert:

	4 µl 10x RT Puffer
+	4 µl dNTP Mix
+	4 µl Oligo-dT Primer
+	5,5 µl H <sub>2</sub> O (RNase-frei)
+	2 µl RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse-Transkriptase)
+	0,5 µl RNase Inhibitor
=	20 µl

Die Reverse Transkriptase und der RNase Inhibitor wurden dabei erst kurz vor Gebrauch aufgetaut. Anschließend wurden 20 µl Total-RNA in H<sub>2</sub>O hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation für 60 min bei 37°C, während dessen die cDNA-Synthese stattfand. Die Probe wurde, sofern die PCR nicht sofort folgte, bei –20°C gelagert.

### **3.2.2.5 Quantitative Real-time PCR (qRT PCR)**

Bei der quantitativen Real-time PCR konnte der gesamte Amplifikationsprozess detektiert werden. Mit Hilfe einer Fluoreszenzdetektion, deren Intensität proportional zur Menge des Amplikons zunahm, konnte so direkt auf die enthaltene Menge einer Nukleotidsequenz geschlossen werden. Als fluoreszierender Reporterfarbstoff wurde SYBR Green verwendet, der durch Einlagerung in Doppelstränge zur Fluoreszenz befähigt war. Zur Messung wurde das MyiQ single colour real-time PCR detection system von Bio-Rad verwendet.

Im ersten Schritt wurde der DNA-Doppelstrang bei Temperaturen über 90°C in 2 Einzelstränge denaturiert. Bei entsprechenden Annealingtemperaturen der Primer konnten diese sich an die Einzelstränge anlagern und das zwischen den Primersequenzen liegende cDNA-Segment vervielfältigen. Durch das Erhitzen auf bis zu 72°C konnten die DNA-Stränge in 5'-3'-Richtung verlängert werden. Die Reaktionslösung enthielt dabei neben den 4 verschiedenen Nucleotidbausteinen auch die thermostabile Taq-DNA-Polymerase, die diese Reaktion katalysierte.

Dafür wurden die benötigten Reagenzien auf Eis aufgetaut. Hierzu gehörten SYBR Green iQ, die Primer und die Plasmid-DNA für die Standardkurve, wobei die Stammlösung eine Konzentration von 1 ng/µl hatte.

Zur Quantifizierung der mRNA-Expressionsrate der zu untersuchenden Gene diente jeweils eine Standardkurve, welche mit Hilfe der entsprechenden Plasmid-DNA

(1 ng/µl) ermittelt wurde. Diese DNA wurde mit freundlicher Unterstützung des Instituts für Biochemie I der Medizinischen Fakultät der FSU Jena zur Verfügung gestellt und stammt aus Klonierungen von Plasmiden mit Hilfe von E. coli. Es wurden fünf Verdünnungen von  $10^{-2}$  bis  $10^{-6}$  ng/µl hergestellt. Alle Schritte erfolgten hierbei auf Eis.

Die Primerlösung wurde ebenfalls auf Eis gelagert und hatte folgende Zusammensetzung:

80 µl H<sub>2</sub>O,

10 µl Primer sense (10 µM)

10 µl Primer antisense (10 µM)

Ein Ansatz für die quantitative Real-time PCR (für jeweils 11 Doppelbestimmungen) war wie folgt zusammengesetzt:

342 µl Reinst-H<sub>2</sub>O

450 µl SYBR Green iQ Supermix

72 µl Primerlösung



Je 24 µl von diesem Mastermix wurden auf jedes PCR-Röhrchen verteilt. Bei den Proben wurde jeweils 1 µl patientenspezifische cDNA hinzupipettiert, bei der no-template-Kontrolle (Negativkontrolle) 1 µl aqua dest. Nach Einstellung und Programmierung der Real-time PCR Maschine wurde die Messung gestartet. Dabei ist die entsprechende Annealingtemperatur der jeweiligen Primer zu beachten. Nachstehend sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer aufgeführt (Tabelle 1):

Tabelle 1: **Charakteristika der in der Arbeit verwendeten Primer.**

	<b>Primersequenz sense</b> <b>Primersequenz antisense</b>	<b>Annealing in °C</b>	<b>PCR-Produkt in bp</b>
<b>β-Aktin</b>	5'-ACC ACG GCC GAG CGG GAA ATC-3' 5'-GAG CCG CCG ATC CAC ACG GAG TA-3'	58	635
<b>hCathepsin B</b>	5'-GCA GCC TCA GCC ACC CAG AT-3' 5'-CCA CCA TTA CAG CCG TCC CCA CAC-3'	60,8	539
<b>hCathepsin H</b>	5'-CGT GGA CTG GCG GAA AAA-3' 5'-CAG AGG GAT GGG GTA GGA G-3'	56,7	646
<b>hCathepsin K</b>	5'-GTG TGG TTC CTG TTG GGC TTT TAG-3' 5'-TCC TTT GTT TCC CCA GTT TTC TCC-3'	57,6	514
<b>hCathepsin L</b>	5'-CCG GGG AGG GCA GTT GAG-3' 5'-CCT TGA GGC CCA GAG CAG TC-3'	57,8	612
<b>hCystatinC</b>	5'-AGC AAC GAC ATG TAC CAC AG-3' 5'-TCT CCT GGT GCA GGC ACA TG-3'	58	377
<b>hGAPDH</b>	5'-CAT CAC TGC CAC CCA GAA GA-3' 5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG-3'	60	254
<b>hMMP3</b>	5'-TGG AGA TGC CCA CTT TGA TGA TG-3' 5'-GAG GTC CAT AGA GGG ACT GAA TG-3'	58	630
<b>hMMP13</b>	5'-TGA TGA TGA AAC CTG GAC AAG-3' 5'-GTC TGG CGT TTT TGG ATG TT-3'	58	821

Alle Primer stammen aus dem Institut für Biochemie I der Medizinischen Fakultät der FSU Jena. Nach der PCR wurden die Produkte bei –20°C aufbewahrt.

Die Quantifizierung der PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem sogenannten Threshold Cycle oder  $C_t$ -Wert. Der  $C_t$ -Wert war jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant überstieg und somit die Amplifikation exponentiell erfolgte. In den ersten Zyklen hingegen, bei denen die Templatekonzentration noch sehr gering war, verlief die PCR-Reaktion linear und in der letzten Phase der Reaktion erreichte sie ein Plateau, da limitierende Faktoren, wie Primer- oder Nucleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität oder Inhibition der PCR-Reaktion durch Generation bestimmter Produkte, auftraten. Parallel dazu wurden in jedem PCR-Lauf bekannte Templatemengen amplifiziert, sodass man vergleichen konnte, welche Templatemenge man bei welchem  $C_t$ -Wert erhielt. Daraus ließ sich eine Standardkurve erstellen, anhand derer man aus einem bestimmten  $C_t$ -Wert auf eine Templatekonzentration schließen konnte.

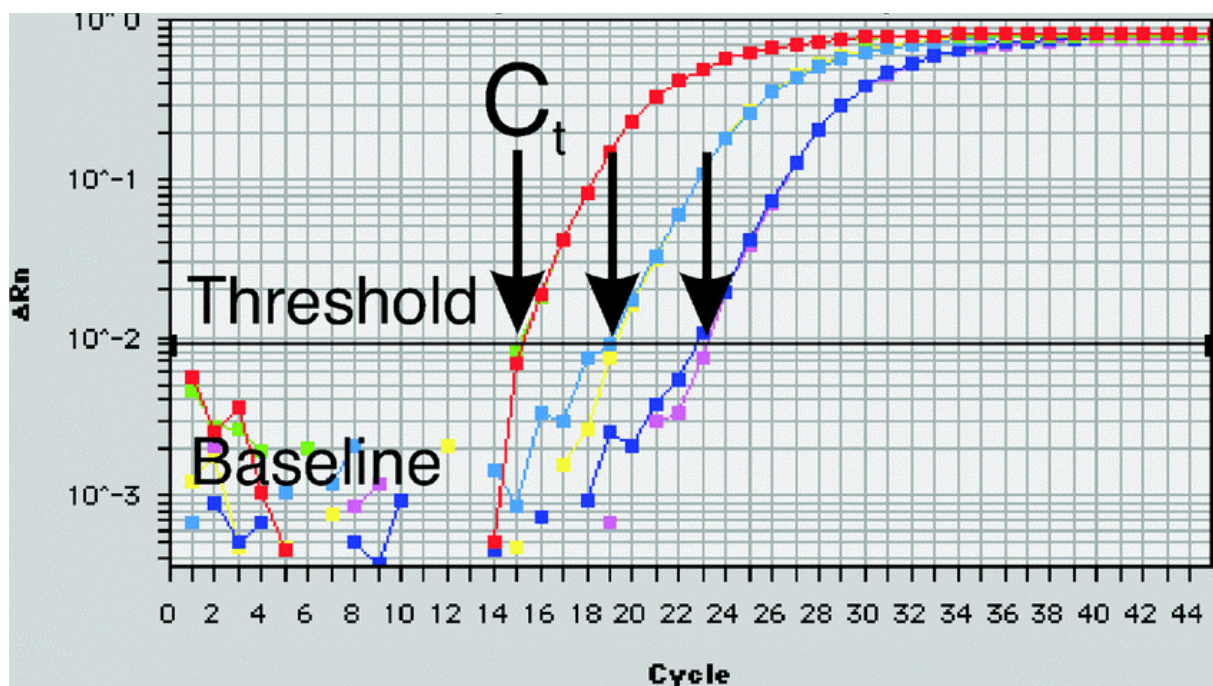


Abbildung 1: PCR-Reaktion und  $C_t$ -Wert-Bestimmung [110]

Der fluoreszierende Reporterfarbstoff SYBR®-Green zeichnet sich durch seine universelle Verwendbarkeit aus, da er unspezifisch eingelagert wird und in jeder beliebigen PCR-Reaktion eingesetzt werden kann. Weiterhin besitzt er eine hohe Signalstärke, da jedes DNA-Molekül mehrere Fluoreszenzmoleküle bindet. Es fehlt jedoch eine spezifische Bindung des Fluorophors an die zu amplifizierende Ziel-DNA, sodass eine Unterscheidung zwischen korrektem Produkt und Artefakt oder Primerdimeren, die ebenfalls einen Fluoreszenzanstieg hervorrufen können, nicht möglich ist. Diese Differenzierung ist mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse gegeben. Dabei kommt es durch schrittweisen Temperaturanstieg zu einer Auftrennung der DNA-Doppelstränge entsprechend ihrem jeweiligen Schmelzpunkt. Die daraus resultierende Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet. Aufgrund der Schmelztemperaturen kann zwischen spezifischen Produkten und Primerdimeren oder Mutationen unterschieden werden, da Primerdimere/Mutationen bei geringeren Temperaturen schmelzen als die spezifischen, größeren PCR-Produkte.

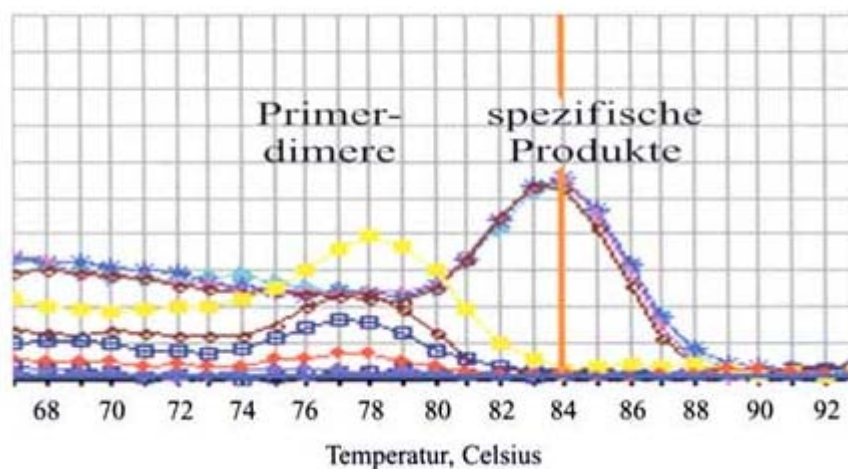


Abbildung 2: Schmelzkurvenanalyse

Die Schmelzkurvenanalyse dient der Unterscheidung der PCR-Produkte und erfolgt im Anschluss an die PCR-Reaktion. Kleinere Fragmente (Primerdimere, Mutationen) weisen eine niedrigere Schmelztemperatur auf als die spezifischen PCR-Produkte [111].

Jede Probe wurde außerdem doppelt vermessen und auf die Expression eines stabil exprimierten Genes (=Houskeeping-Gen) bezogen. Als Referenzgen wurde  $\beta$ -Aktin verwendet.

#### **3.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese für DNA**

Geladene Teilchen haben die Eigenschaft, in einem elektrischen Feld zu dem ihrer Ladung entgegengesetzten Pol zu wandern. Davon macht die Gelelektrophorese Gebrauch. Neben der Ladung ist auch die Größe der Teilchen für die Wanderungsgeschwindigkeit entscheidend. Die negativ geladenen DNA-Teilchen wandern in einem Agarosegel zur Anode. Dabei wandern die größeren Fragmente langsamer als die kleineren.

Zur Herstellung eines Agarose-Gels wurden abhängig von der gewünschten Konzentration die entsprechende Menge Agarose in 1x TAE-Puffer durch aufkochen in der Mikrowelle gelöst und anschließend in einen Gelschlitten mit eingesetztem Kamm gegossen. Die Dichte des Gels nach dem Erhärten wird von der Menge der eingewogenen Agarose bestimmt. Jeweils 25  $\mu$ l PCR-Produkt wurden mit 6  $\mu$ l Gel-Ladepuffer versetzt und dann in die Taschen des Gels aufgetragen. Vor die Proben wurden 5  $\mu$ l des 100 bp Markers aufgetragen, anhand dessen die Größe der PCR-Produkte ermittelt werden konnte.

### **3.2.3 Histologie**

#### **3.2.3.1 Anfertigen von Knorpelgefrierschnitten**

Bei der histologischen Präparation wurde das Knorpelstück auf Trockeneis mittels Skalpell und Pinzette in 3 Einzelstücke zerteilt. Das Mittelstück wurde auf die Schnittfläche gestellt und vollständig in Tissue-Tek<sup>®</sup> eingebettet. Die Lagerung des Präparates erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Das Kryostat diente der Anfertigung von Gefrierschnittserien, die, auf die Objektträger aufgezogen, eine Nacht antrockneten.

### **3.2.3.2 Safranin-O-Färbung**

Die verwendete Safranin O-Färbung diente dem spezifischen Nachweis von Glykosaminoglykanen, die einen Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix im Knorpel bilden. Als Gegenfärbung wurde Lichtgrün verwendet, welches Proteine unspezifisch anfärbt [112].

Der Ablauf der Safranin-O-Färbung gliederte sich in folgende Schritte:

10 min Eintauchen in Safraninlösung

3 x Spülen mit H<sub>2</sub>O

10 min Inkubieren in Lichtgrün

1 x Spülen mit H<sub>2</sub>O

aufsteigende Ethanolreihe (70%, 96%, 96%, 100%, 100%)

2 x 10 min Inkubieren in Xylol

Zum Eindecken der Präparate wurde entweder DRX Mountant for histology oder Canada Balsam verwendet.

### **3.2.3.3 Knorpelstatus und Osteoarthrosedokumentation (MANKIN-Score)**

Die histologische Beurteilung erfolgte mit dem MANKIN-Score [113]. Dabei wurden die Safranin-O gefärbten Schnitte nach vier Gesichtspunkten beurteilt: Struktur, Zellverteilung und -dichte, Anfärbung durch Safranin O und Intaktheit der Knorpel-Knochen-Grenze. Die entsprechenden Punktwerte (siehe Tabelle 2) wurden addiert und ergaben eine Gesamtsumme zwischen 0 und 14. Werte unter 5 entsprechen

dabei einem normalen Knorpel, der Werte über 5 einer degenerativen Arthrose [114]. Das Grading wurde für jedes Präparat von zwei Beobachtern unabhängig voneinander vorgenommen und die Punktwerte wurden jeweils gemittelt.

**Tabelle 2: Histologische Beurteilung nach MANKIN [113, 115]:**

I. Struktur	Normal	0
	Oberflächenunregelmäßigkeiten	1
	Pannus, Oberflächenunregelmäßigkeiten	2
	Risse bis in die Übergangszone	3
	Risse bis in die Radiärzone	4
	Risse bis in die verkalkte Zone	5
	Komplette Desorganisation	6
II. Zellen	Normal	0
	Diffuse Hyperzellularität	1
	Cloning	2
	Hypozellularität	3
III. Safranin O	Normal	0
	Geringe Reduktion	1
	Mäßige Reduktion	2
	Starke Reduktion	3
	Keine Färbung nachweisbar	4
IV. Integrität der Knorpel-Knochen-Grenze	Intakt	0
	Von Blutgefäßen durchzogen	1

Wie Abbildung 3 zeigt, gibt es außer dem mikroskopischen Grading nach MANKIN ein makroskopisches Grading-System nach COLLINS [116]. Somit können histopathologische und morphologische Knorpelveränderungen einander zugeordnet werden.

Grad 0 nach COLLINS entspricht einem normalen Knorpel, Grad 1 einem fast normalen Knorpel mit oberflächlichen Läsionen. Ab Grad 2 handelt es sich um degenerativen Knorpel mit Defekten, die weniger als 50% der Knorpeltiefe befallen. Bei Grad 3 dehnen sich die Veränderungen über mehr als 50% der Knorpeltiefe aus und bei Grad 4 ist freiliegender Knochen vorzufinden [116].

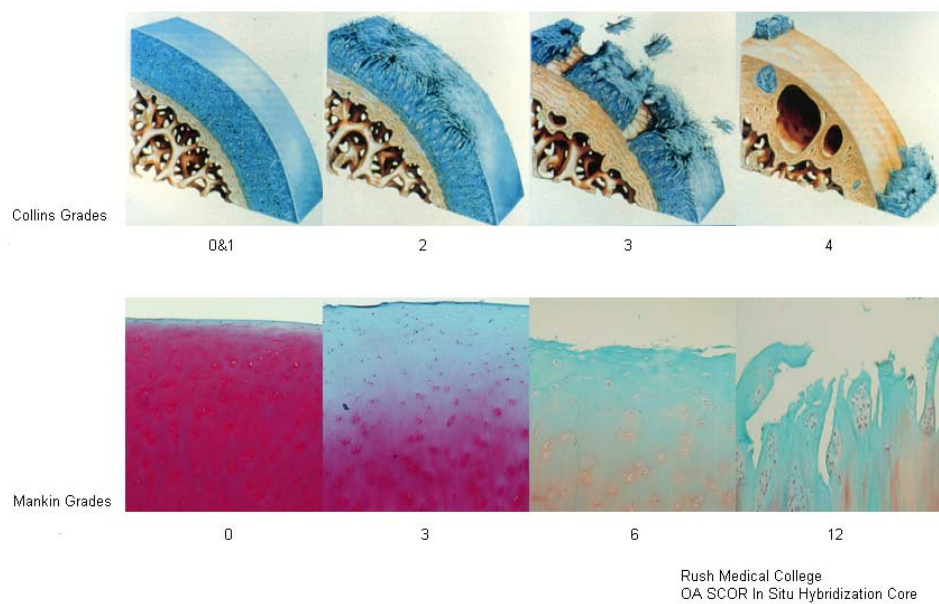


Abbildung 3: Vergleich der Grading-Systeme nach COLLINS und MANKIN [113, 116].  
Aufgezeigt werden makroskopische und mikroskopische Knorpelveränderungen mit den entsprechenden Grading-Punktwerten.

### 3.2.4 Statistik

Soweit nicht anders angegeben, sind alle Daten als Median  $\pm$  SEM dargestellt. Bei der Untersuchung auf signifikante Unterschiede bei der mRNA-Expression wurde der t-Test eingesetzt. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten  $<0,05$  angenommen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung des Patientenguts

Der verwendete Knorpel stammte von insgesamt 10 Gonarthrose-Patienten der Orthopädischen Klinik der Universität Jena in Eisenberg. Darunter waren 3 Frauen und 7 Männer, deren Alter im Median bei  $62 \pm 17$  Jahren lag.

Im Rahmen orthopädischer Eingriffe – die Patienten bekamen eine Knieendoprothese – fiel das zur Durchführung der Experimente benutzte Material an. Es wurde ausschließlich Gewebe verwendet, welches nach dem Eingriff verworfen worden wäre. Die Indikation zum Gelenkersatz wurde anhand klinischer und röntgenologischer Parameter festgelegt. Bei 3 Patienten wurde eine Varusgonarthrose diagnostiziert und bei einem Patienten eine sekundär entstandene Pagonarthrose in Valgusfehlstellung. Die übrigen Patienten zeigten keine signifikanten Achsabweichungen, jedoch ein Patient eine Retropatellararthrose. Es war sechsmal das linke und viermal das rechte Bein betroffen.

Zusätzlich konnte eine Knorpelprobe einer 83-jährigen Patientin mit Oberschenkelamputation links gewonnen werden, die keine klinische Arthrose-Symptomatik aufwies. Die Amputation erfolgte aufgrund eines diabetischen Fußes.

Anhand des Anamnesebogens wurden Angaben zu Alter, Geschlecht, Stoffwechsel- und Gefäßerkrankungen und zur momentanen Medikation notiert. Bei einem großen Teil der Patienten wurden als Vorerkrankungen Hypertonie, akute Blutungsanämie und Arthrose anderer Gelenke mit z.T. schon erfolgtem Gelenkersatz diagnostiziert. Der jüngste Patient wies neben einer Arthrose beider Hüftgelenke mit Endoprothesenversorgung als einziger eine bösartige Neubildung auf. Weitere anamnestische Patientendaten sind in Tabelle 3 aufgelistet.



Tabelle 3: **Zusammenfassende Auflistung relevanter Patientendaten.**

	Alter	m/w	Diagnose	Vorerkrankungen/Besonderheiten
<b>SL</b>	45	m	Gonarthrose li.	sonstige sekundäre Coxarthrose (beidseitig) Verlust eines oder mehrerer Genitalorgane Bösartige Neubildung der Genitalorgane in der Eigenanamnese; <sup>1</sup>
<b>JI</b>	58	w	Gonarthrose re.	depressive Episode schwierige Intubation; <sup>1</sup>
<b>SK</b>	65	m	Gonarthrose li.	Lungenembolie ohne Angabe eines akuten Cor pulmonale Vorhandensein von orthopädischen Gelenkimplantaten Ulcus ventriculi disseminierte intravasale Gerinnung (DIG,DIC) Thrombozytopenie, nicht als transfusionsrefraktär bezeichnet; <sup>1,2</sup>
<b>SU</b>	69	w	Gonarthrose re. Retropatellar- arthrose	<sup>2</sup>
<b>WG</b>	70	w	Varusgonarthrose li. Z.n. OS-Amputation re.	Harnwegsinfektion Escherichia coli und andere Enterobakterien als Ursache von Krankheiten Divertikulose des Dickdarms ohne Perforation, Abszeß ohne Angabe einer Blutung Verlust der unteren Extremität oberhalb des Knies, einseitig; <sup>1,2</sup>
<b>TI</b>	70	w	Varusgonarthrose li.	Allergie gegenüber sonstigen Arzneimitteln Drogen oder biologisch aktive Substanzen in der Eigenanamnese Hyperlipidämie; <sup>2</sup>
<b>SH</b>	72	w	Gonarthrose re.	hypertensive Herzkrankheit mit (kongestiver) Herzinsuffizienz ohne Angabe einer hypertensiven Krise kardiale Arrhythmie Dauertherapie (gegenwärtig) mit Antikoagulanzen; <sup>1</sup>
<b>KH</b>	72	w	Gonarthrose re.	Läsion des N. fibularis (peroneus) communis Vorhandensein von orthopädischen Gelenkimplantaten; <sup>1,2</sup>
<b>GJ</b>	74	m	Valgusgonarthrose li.	wahnhafte Störung Herzinsuffizienz; <sup>1</sup>
<b>BH</b>	79	w	Varusgonarthrose li. diabet. Fuß	Hyperthyreose; <sup>2</sup>
<b>BI</b>	83	w	OS-Amputation li. diabet. Fuß	
<p>In der Tabelle verwendete Abkürzungen:</p> <p><sup>1</sup> akute Blutungsanämie  <sup>2</sup> essentielle Hypertonie ohne hypertensive Krise  Z.n. Zustand nach  re. rechts  li. links  k.A. keine Angaben</p>				

Die nachfolgenden histologischen Bilder (Abbildung 4A-D) sind Knorpelpräparate von ausgewählten Gonarthrose-Patienten. Sie wurden mit Safranin O/Lichtgrün gefärbt und mit einem Durchlichtmikroskop der Firma ZEISS betrachtet und beurteilt. Mit dem Mikroskop war eine Digitalkamera (LEICA) verbunden. Die histologische Auswertung der Präparate erfolgte nach einem von MANKIN entwickelten Schema zur Bewertung von osteochondralen Defekten.

Dabei ist zu beachten, dass nur Gelenkabschnitte untersucht wurden, die makroskopisch Knorpel enthielten. Untypisches Gewebe (Faserkallus, Osteophyten) gelangten nicht in die Untersuchung.

Beurteilt wurden Struktur, Zellverteilung und –dichte, Anfärbung durch Safranin O, welche mit dem Glykosaminoglykangehalt im Knorpel korreliert [112], und Intaktheit der Knorpel-Knochen-Grenze. Jedes Präparat erhielt so eine Punktzahl (Score) zwischen 0 und 14. Eine niedrige Punktzahl entsprach einem gesunden hyalinen Knorpel. Je höher die Punktzahl war, desto mehr wich der Knorpel morphologisch und strukturell von hyalinem Knorpel ab. Mit zunehmender Knorpeldestruktion kommt es zu einer verminderten Rotfärbung im oberen Knorpelbereich, was für einen verringerten Glykosaminoglykananteil und somit einen Verlust an extrazellulärer Matrix spricht. Desweiteren sprechen Hypozellularität, Chondrozytennester und Veränderungen im Umgebungsknorpel für degenerative Veränderungen im Knorpel.

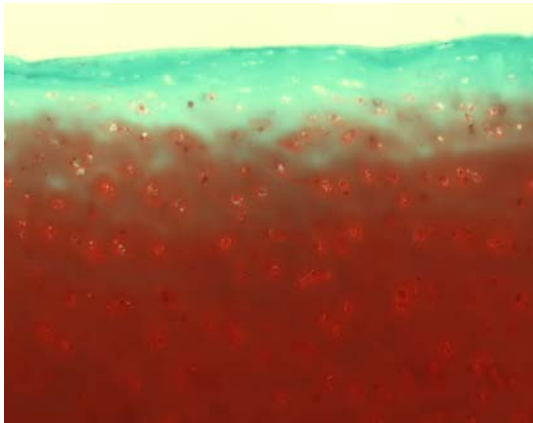


Abbildung 4A: **Knorpelgefrierschnitt von SL**

Dieses Knorpelpräparat mit einem MANKIN grade von 1 zeigt nur wenige destruktive Veränderungen. Die Oberfläche ist glatt, die Zellzahl normal, es besteht lediglich ein leichter Proteoglykanverlust.

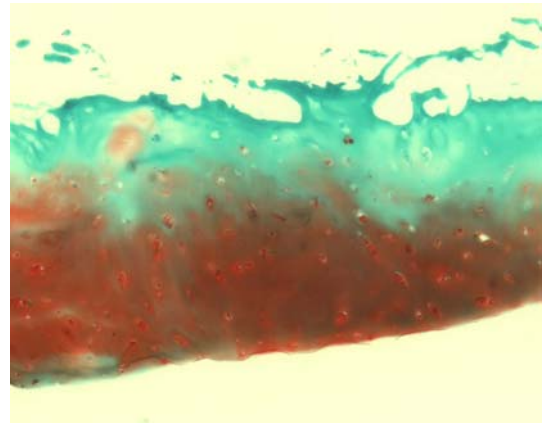


Abbildung 4B: **Knorpelgefrierschnitt von SK**

Aufgrund der zerklüfteten Oberfläche, der leicht erhöhten Zellzahl und des reduzierten Proteoglykangehaltes liegt hier bereits ein MANKIN grade von 6 vor.

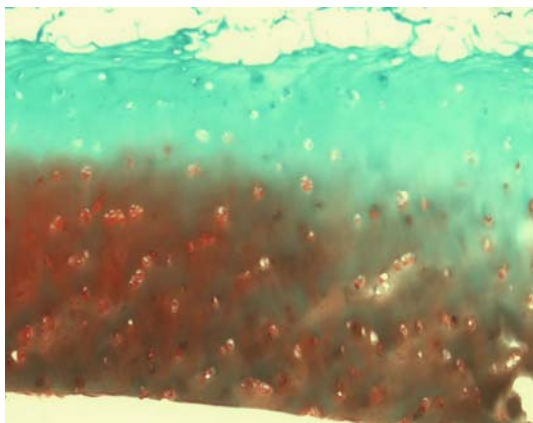


Abbildung 4C: **Knorpelgefrierschnitt von TM**

Dieses histologische Bild zeigt eine zerklüftete Oberfläche, eine erhöhte Zellzahl, hypertrophe Chondrozyten und einen Proteoglykanverlust. Das Präparat entspricht deshalb schon einem MANKIN grade von 7.

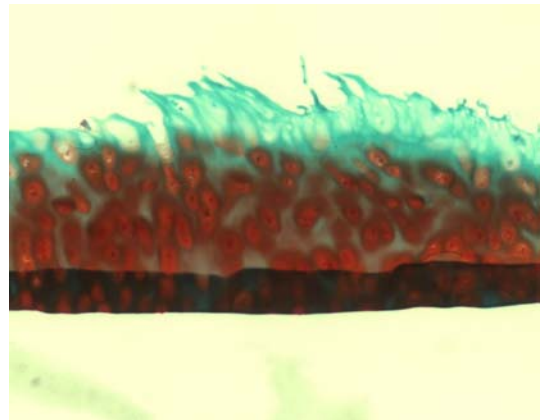


Abbildung 4D: **Knorpelgefrierschnitt von BA**

Hier ist ein MANKIN grade von 9 festzustellen. Diese Oberfläche ist zerklüftet, die Chondrozyten sind stark hypertrophiert und der Proteoglykangehalt ist stark vermindert.

#### 4.1.1 Röntgenologische Auffälligkeiten

Da neben der klinischen Untersuchung des Kniegelenkes die röntgenologische Darstellung bei Verdacht auf Kniegelenksarthrose Diagnostik der Wahl ist, sollen anhand einiger ausgewählter Bilder die radiologischen Auffälligkeiten bei Gonarthrose beschrieben werden. Die Aufnahmen wurden im Rudolf-Elle-Krankenhaus Eisenberg präoperativ angefertigt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Geröntgt wurde generell stehend, a.p. und zum Teil zusätzlich stehend, seitlich und/oder sitzend, seitlich.

Typische röntgenologische Veränderungen sind Gelenkspaltverschmälerung mit eventuell daraus resultierender Achsfehlstellung, subchondrale Sklerosierung, Knochenzysten und osteophytäre Anbauten. Diese sind in den Abbildungen 5A-C nachzuvollziehen.

Exemplarisch sollen im folgenden drei der zehn Patienten näher charakterisiert werden, um klinisch auffällige und typische Krankheitssymptome aufzuzeigen. Auffällige anamnestische Daten bei Patientin SH waren Endglied- und Teilamputation des Mittelgliedes des linken Mittelfingers, eine Hysterektomie, die Entfernung zweier gutartiger Tumoren des linken Ovars, akute Blutungsanämie, hypertensive Herzkrankheit mit Herzinsuffizienz ohne hypertensive Krise, kardiale Arrhythmie und Dauertherapie mit Antikoagulanzen. Im Röntgenbild (Abbildung A) fällt am linken Knie eine Varusfehlstellung von  $16^\circ$  auf. Der mediale Gelenkspalt ist verschmälert und osteophytäre Anbauten sind sichtbar. Patient GJ beschrieb anamnestisch einen Autounfall 1945, bei dem es zu Frakturen des linken Armes und Beines kam, eine Hüft-TEP rechts 1991, die 4-fach Bypass-OP 1997, medikamentös eingestellte Hypertonie, koronare Herzkrankheit bei Z.n. Hinterwandinfarkt 1997, Hyperlipoproteinämie, akute Blutungsanämie, Herzinsuffizienz, Adipositas, COPD, Presbycusis rechts und wahnhaftige Störungen. Röntgenologisch zeigen Abbildung B und C eine Pangonarthrose links in Valgusfehlstellung mit multidirektionaler Instabilität. Auf Grund der in Fehlstellung konsolidierten Unterschenkelfraktur im proximalen Drittel entstand eine Valgusgonarthrose mit einem Valguswinkel von  $25^\circ$ . Der laterale und der mediale Gelenkspalt waren vollständig aufgehoben und es kam

zu osteophytären Anbauten. Klinisch zeigte sich zusätzlich die deutlich Atrophie der Ober- und Unterschenkelmuskulatur.

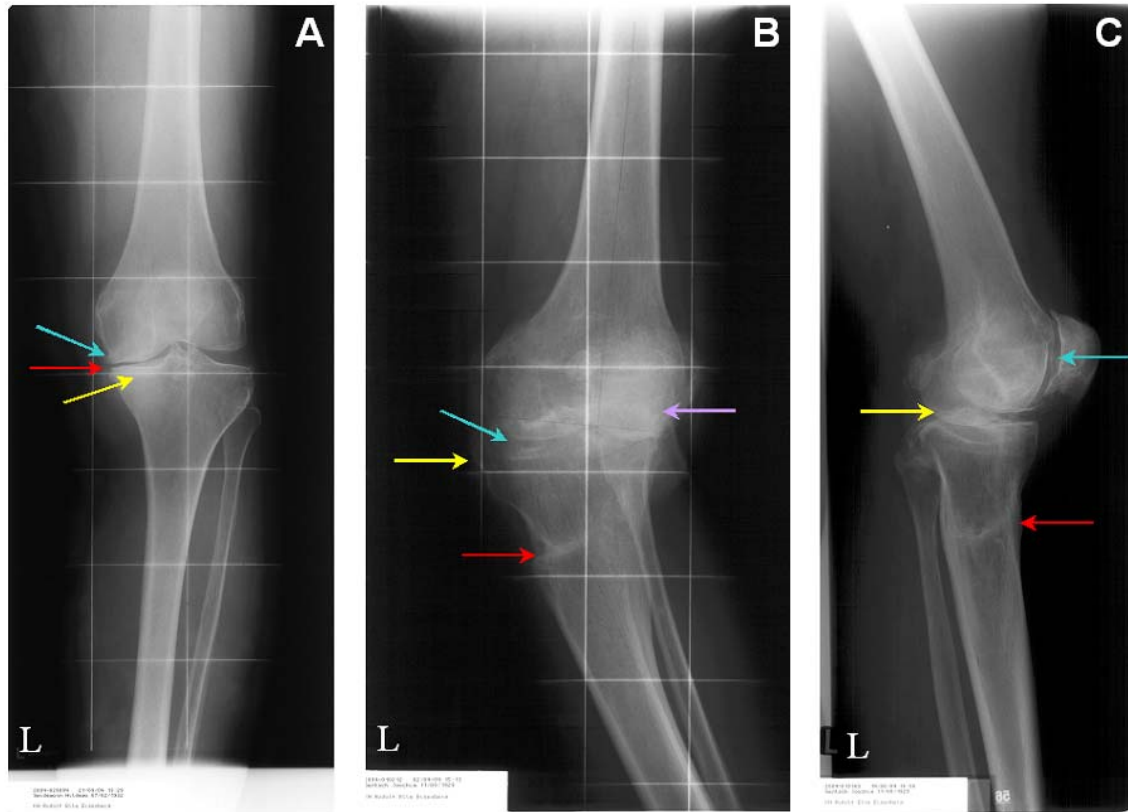


Abbildung 5: **Ausgewählte radiologische Aufnahmen von Patienten mit Gonarthrose.**

A: Radiologische Aufnahme von SH stehend, a.p.

Auf diesem Röntgenbild sind die typischen morphologischen Veränderungen bei einer Gonarthrose zu erkennen. Der rote Pfeil zeigt die Verschmälerung des medialen Gelenkspaltes bei einer Varusfehlstellung von  $16^\circ$ . Der blaue Pfeil weist auf beginnende osteophytäre Anbauten und der gelbe Pfeil auf die subchondrale Sklerosierung hin.

B: Radiologische Aufnahme von GJ stehend, a.p.

Die arthrotischen Veränderungen bei diesem Patienten entstanden sekundär als Folge eines Autounfalls (Tibia-Fraktur, roter Pfeil). Die Ausheilung in Fehlstellung führte zu einem Valguswinkel von  $25^\circ$ , Verschmälerung bis Aufhebung des Gelenkspaltes (blauer Pfeil), osteophytären Anbauten (gelber Pfeil) und subchondraler Sklerosierung (violetter Pfeil).

C: Radiologische Aufnahme von GJ stehend, seitlich

Auf dem zweiten Röntgenbild ist die Frakturlinie (roter Pfeil) deutlich sichtbar, ebenso die Aufhebung des Gelenkspaltes (gelber Pfeil). Zusätzlich ist hier auch die Retropatellararthrose nachweisbar. Die Diagnose ist somit eine ausgeprägte Pangonarthrose.

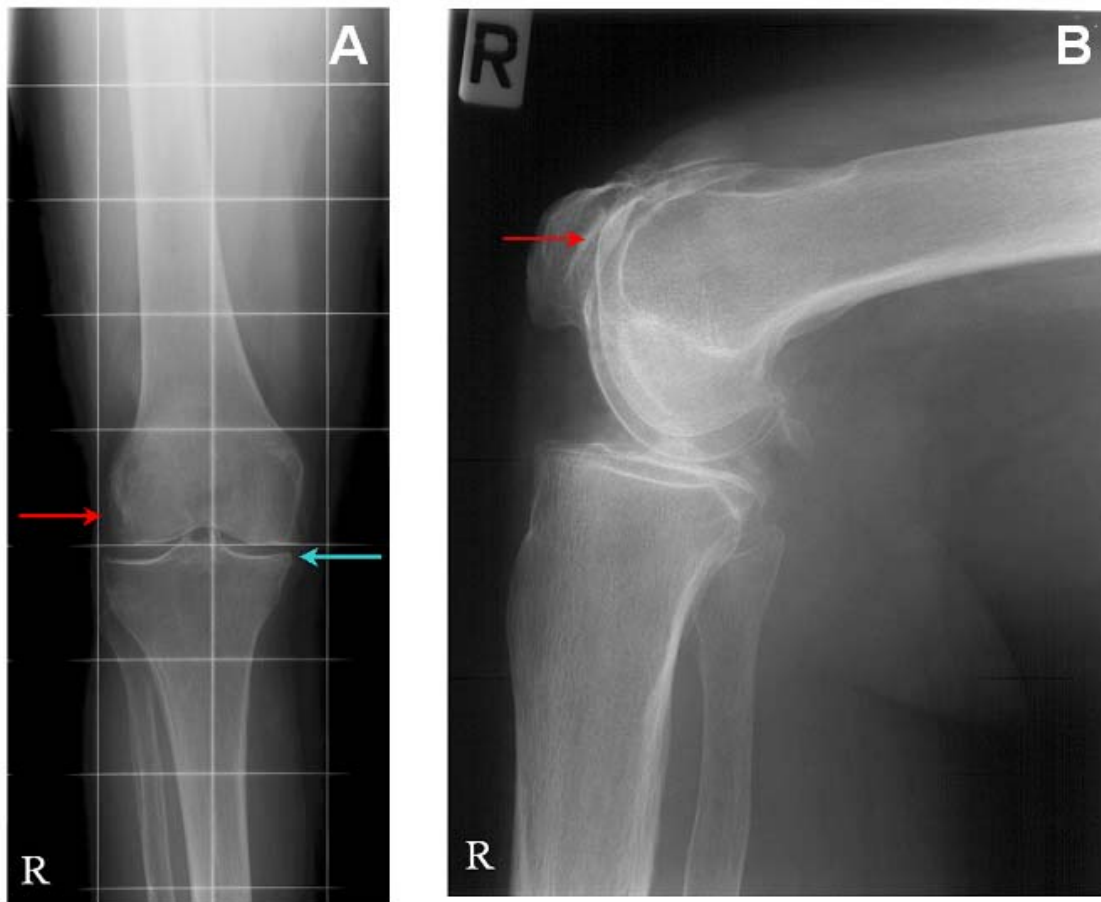


Abbildung 6: **Radiologische Aufnahmen von SU.**

A: Radiologische Aufnahme von SU stehend, a.p.

Das Röntgenbild (stehend) des Patienten mit den auffälligen Expressionswerten ist nahezu unauffällig. Der rote Pfeil deutet auf eine subchondrale Knochenzyste, der blaue Pfeil zeigt beginnende osteophytäre Veränderungen.

B: Radiologische Aufnahme von SU sitzend, seitlich

Das zweite Röntgenbild (sitzend) hingegen macht deutlich sichtbar (roter Pfeil), dass eine Retropatllararthrose vorliegt.

Bei der stationären Aufnahme von SU erhobene Daten waren eine Hüft-TEP links 1994, OP wegen grauem Star links und rechts 2002, Thrombose, Lungenembolie 2003, essentielle Hypertonie ohne hypertensive Krise und ein extremes Übergewicht bei einem Body Mass Index von 32,1. Abbildung 6A und 6B zeigt die zugehörigen Röntgenbilder. Es war keine Fehlstellung festzustellen und auch der Gelenkspalt zeigte keinen Befund einer Gonarthrose. Lediglich retropatellar konnten Veränderungen im Sinne einer Osteoarthrose diagnostiziert werden.

## 4.2 Analyse der mRNA-Expression in Chondrozyten bei Osteoarthrose

### 4.2.1 RNA-Isolierung und RT-Schritt

Die RNA-Isolierung mit Trizol erfolgte nach Herstellerangaben. Die aus den Chondrozyten gewonnene RNA wurde spektrophotometrisch analysiert. Dabei wurde die RNA-Konzentration und die Ratio 260/280 bestimmt. Nachstehende Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung:

Tabelle 4: Bestimmung der RNA-Konzentration bzw. Ratio 260/280 des Patientengutes

	RNA-Konzentration in µg/ml	Ratio 260/280
SL	754,46	2,1
JI	133,09	2,1
SK	383,92	2,3
SU	76,92	n.d.
WG	36,35	2,3
TI	125,77	2,2
SH	404,28	1,95
KH	542,33	1,9
GJ	2229,69	2,1
BH	320,05	2,0
BI	220,64	n.d.
In der Tabelle verwendete Abkürzungen: n.d. nicht bestimmt		

Die gewonnene Total-RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Ein Oligo(dT) Primer konnte hierbei mit Hilfe der reversen Transkriptase einen zu der RNA komplementären DNA-Strang (cDNA) herstellen, welcher dann als Matrize in der PCR diente.

#### **4.2.2 Detektion der mRNA mittels qRT PCR**

Mit Hilfe der quantitativen Real-time-PCR wurde das Expressionsmuster für die Cathepsine B, H, K und L, Cystatin C, MMP3 und MMP13 in osteoarthrotisch veränderten Chondrozyten untersucht. Bei der Durchführung der Real-time-PCR mit dem MyiQ single colour Real-time PCR detection system von Bio-Rad wurden zum Ausschluss eventueller Pipettierfehler bei jeder PCR eine Negativkontrolle mitgeführt und es wurden für jede Probe Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Kurven dokumentieren den Anstieg der Fluoreszenzemission des kontinuierlich an die neu amplifizierten DNA-Fragmente bindenden SYBR-Greens. Dabei war der charakteristische Verlauf einer PCR-Reaktion zu erkennen, der in Abb. 7 deutlich wird: Zunächst lag ein linearer Anstieg vor, in dem die PCR-Reaktion unter optimalen Bedingungen ablief, dass heißt pro Zyklus kam es zur Verdopplung der Matrizenstränge. Durch limitierende Faktoren, insbesondere Primer- oder Nucleotidmangel, ging die Kurve später in eine Plateauphase über. Wie die Kurvenverläufe bei verschiedenen Verdünnungen zeigten, ließen sich in dieser Phase die ursprünglichen Ausgangsmengen einer eingesetzten Matrizen-DNA nicht mehr bestimmen. Deshalb war es unabdingbar, jegliche Quantifizierung innerhalb des linearen Bereiches vorzunehmen. Die Anzahl der Zyklen, die notwendig waren, bis das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert erreicht hatte, wird als  $C_t$ -Wert bezeichnet. Die  $C_t$ -Werte der einzelnen Proben konnten miteinander verglichen werden. Dabei war eine Aussage über die in den Proben vorhandene Ausgangsmenge an Matrizen-DNA möglich.



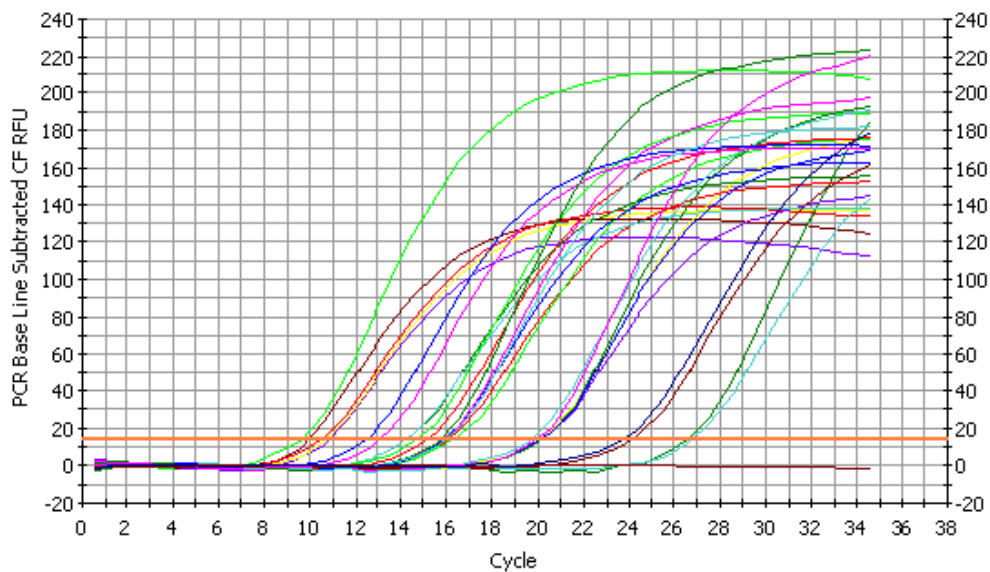


Abbildung 7: **Verlauf einer PCR-Reaktion in linearer Darstellung.**

Die Graphen zeigen den typischen Verlauf einer PCR-Reaktion. Die orange horizontale Linie stellt den Schwellenwert dar.

Parallel dazu wurden in jedem PCR-Lauf bekannte Templatemengen amplifiziert, sodass man vergleichen konnte, welche Templatemenge man bei welchem  $C_t$ -Wert erhielt. Daraus ließ sich eine Standardkurve erstellen, anhand derer man aus einem bestimmten  $C_t$ -Wert auf eine Templatekonzentration schließen konnte.

Trug man die dem  $C_t$ -Wert entsprechende Zyklenzahl der verdünnten Proben gegen den Logarithmus der Ausgangsmenge graphisch auf und generierte anschließend eine Ausgleichsgerade, so ließ sich anhand des Korrelationskoeffizienten erneut die Genauigkeit des Pipettierens bestimmen. Dieser sollte möglichst nahe 1 liegen. Weiterhin errechnete das Gerät die PCR-Effizienz der jeweiligen Reaktion, die möglichst nahe 100% liegen sollte. Dabei wurden nicht nur die Verdünnungsreihen mit einbezogen, sondern es wurde ebenfalls die Synthese anderer Produkte als das Ziel-Amplifikat berücksichtigt, an die sich SYBR-Green auch anlagert. Die in Abb. 8 gezeigte Ausgleichsgerade ergab eine PCR-Effizienz von 77,1% und einen Korrelationskoeffizienten von 0,999.

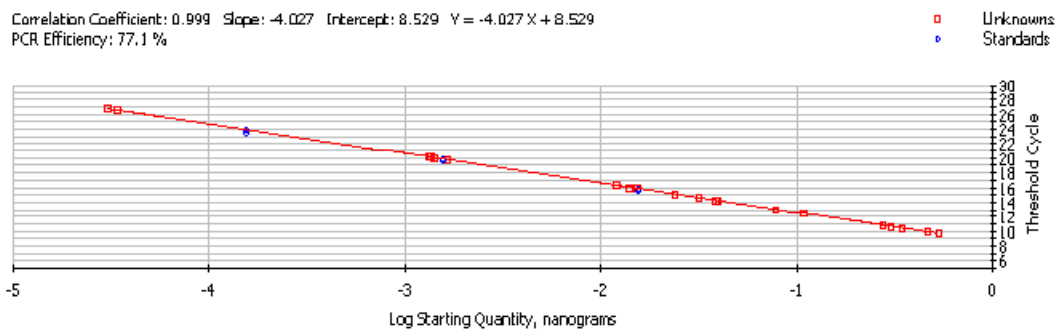


Abbildung 8: **Standardgerade von MMP 3**

Der Korrelationskoeffizient, ein Maß für die Pipettiergenauigkeit, liegt bei 0,999 und die PCR-Effizienz, die neben der Pipettiergenauigkeit die eventuelle Anlagerung von Sybr-Green an andere doppelsträngige Produkte berücksichtigt, bei 77,1.

Zur Kontrolle, ob nur das Ziel-Gen oder fälschlicherweise auch weitere DNA-Fragmente amplifiziert wurden, wurde zu Ende eines jeden PCR-Laufes eine Schmelzkurve durch die kontinuierliche Erhöhung der Temperatur von 50°C auf 100°C generiert. Parallel wurde die Fluoreszenzemission dokumentiert, die sich mit steigender Temperatur beim Aufschmelzen der Amplifikate verringerte. Trug man  $-dF/dT$  (delta Fluoreszenz /delta Temperatur) gegen die Temperatur auf, sollte ein einziger Maximalwert zu erkennen sein. Lagen noch andere Maxima vor, wies dies auf die Amplifikation weiterer Produkte hin. Die Schmelzkurven der PCR-Produkte, für die dasselbe Primerpaar eingesetzt wurde, sollten sich überlagern. Abb. 9 zeigt die Schmelzkurven der MMP 3-Real-time-PCR. Jede Kurve enthält nur ein Maximum, wobei sich die Maxima der einzelnen Kurven überlagern. Somit ist in allen Proben ausschließlich das gleich PCR-Fragment amplifiziert worden.

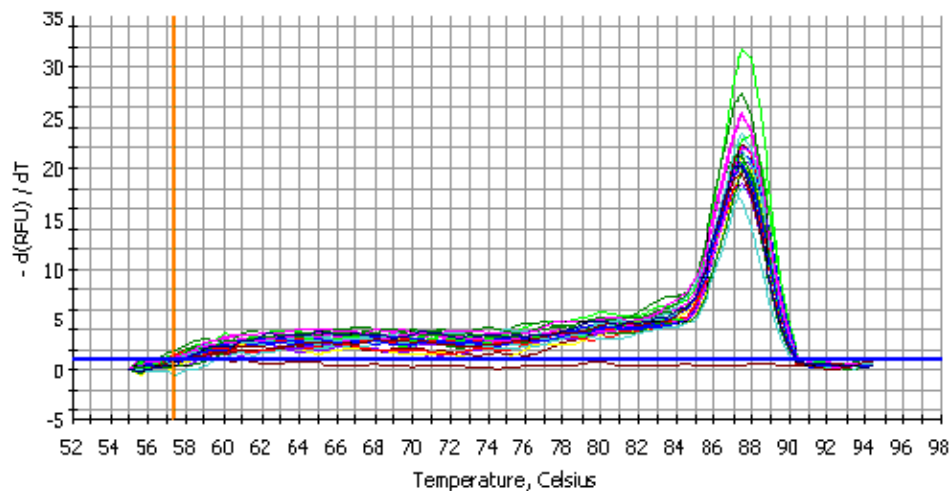


Abbildung 9: **Schmelzkurven der MMP-3 Real-time PCR**

Jede Kurve zeigt nur ein deutliches Maximum, wobei sich die Maxima überlagern.

Um zu verhindern, dass unterschiedliche Ausgangsmengen an Gesamt-RNA zu Fehlinterpretationen bei der Analyse der einzelnen Proben führen, wurden die Daten der Real-time-PCRs mit dem konsekutiv gleichmäßig exprimierten (housekeeping) Gen  $\beta$ -Aktin, in Relation gesetzt. Dazu wurde für jede Probe und jede Verdünnung eine eigene parallele  $\beta$ -Aktin-PCR im gleichen Lauf mitgeführt.

#### 4.2.3 Auswertung der qRT PCR

Die Darstellung der mRNA-Expressionswerte erfolgte in Form von Säulendiagrammen. Dabei wurden die Patienten nach dem Alter geordnet. Der Mittelwert der durch Doppelbestimmung gewonnenen Expressionswerte wurde ins Verhältnis gesetzt zur mRNA-Expression von  $\beta$ -Aktin jedes Patienten.  $\beta$ -Aktin ist ein Housekeeping-Gen und dient somit als Referenz. Außerdem eingezeichnet wurde der jeweilige „Expressions-Normalwert“ des Kontrollpatienten NK. Die mRNA-Expressionswerte der Patienten konnten also sowohl mit denen im „Normalknorpel“ als auch mit den Werten für  $\beta$ -Aktin verglichen werden.

#### 4.2.3.1 Cathepsin B

Wie in Abbildung 10 ersichtlich, waren bei SL, SU, WG, SH ( $p < 0,01$ ), JI, SK, TI und BH ( $p < 0,05$ ) Werte mit signifikantem Unterschied zum „Normalknorpel“ zu erheben. Die Patienten zeigten jedoch maximal 15-mal höhere Expressionswerte für Cathepsin B als im „Normalknorpel“ mit Ausnahme von SU, dessen mRNA-Expressionswert mehr als 500-mal höher lag als im „Normalknorpel“.

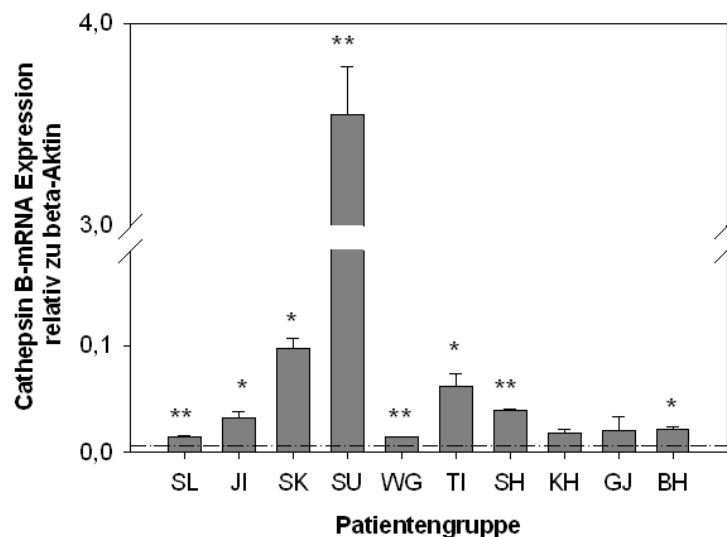


Abbildung 10: **Cathepsin B-mRNA Expression in humanen Chondrozyten.**

Die Chondrozyten wurden durch einen Verdau mit Kollagenase gewonnen. Nach einer Adhärenzphase von 24 h wurden die Zellen in Trizol aufgenommen und anschließend die RNA isoliert. Als Referenz diente die Cathepsin B-mRNA-Expression im „Normalknorpel BI (Strich-Punkt-Linie)“. Signifikante Unterschiede zwischen „Normalknorpel“ und OA-Knorpel sind mit \* gekennzeichnet (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

#### 4.2.3.2 Cathepsin H

Abbildung 11 zeigt, dass verglichen mit dem „Normalknorpel“ bei keinem Patienten ein signifikanter Unterschied zur normalen Situation festzustellen war. Die Patienten JI, WG, SH, KH, GJ und BH hatten sogar niedrigere mRNA-Expressionswerte für Cathepsin H als der „Normalknorpel“. Ein mehr als  $10^4$ -fach erhöhter Expressionswert wurde hingegen bei Ausnahmepatient SU gemessen.

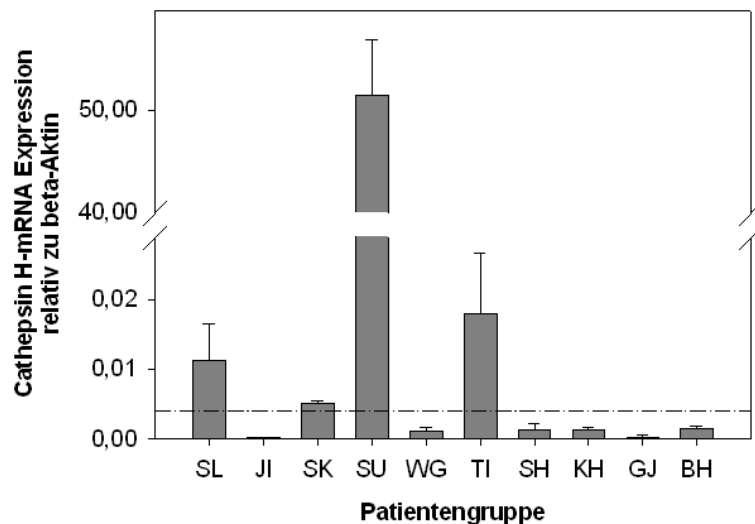


Abbildung 11: **Cathepsin H-mRNA Expression in humanen Chondrozyten.**

Die Chondrozyten wurden durch einen Verdau mit Kollagenase gewonnen. Nach einer Adhärenzphase von 24 h wurden die Zellen in Trizol aufgenommen und anschließend die RNA isoliert. Als Referenz diente die Cathepsin H-mRNA-Expression im „Normalknorpel BI (Strich-Punkt-Linie)“.

#### 4.2.3.3 Cathepsin K

Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, war nur bei SU ( $p < 0,05$ ) ein mRNA-Expressionswert für Cathepsin K mit signifikantem Unterschied zum „Normalknorpel“ festzustellen. Die Werte der Patienten JI, WG, SH und KH lagen sogar unterhalb des „Normalknorpels“. Die übrigen Patienten zeigten Expressionswerte, die vom 1,4–fachen des Normalknorpels bei TI bis zu 47,6–fachen bei SU reichten.

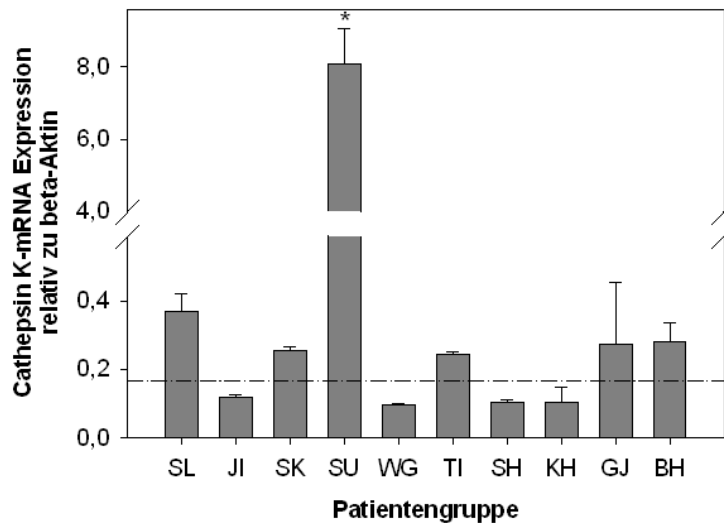


Abbildung 12: **Cathepsin K-mRNA Expression in humanen Chondrozyten.**

Die Chondrozyten wurden durch einen Verdau mit Kollagenase gewonnen. Nach einer Adhärenzphase von 24 h wurden die Zellen in Trizol aufgenommen und anschließend die RNA isoliert. Als Referenz diente die Cathepsin K-mRNA-Expression im „Normalknorpel BI (Strich-Punkt-Linie)“. Signifikante Unterschiede zwischen „Normalknorpel“ und OA-Knorpel sind mit \* gekennzeichnet (\*  $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3.4 Cathepsin L

Abbildung 13 zeigt, dass für SU, WG und KH ( $p < 0,05$ ) Werte mit signifikantem Unterschied zum „Normalknorpel“ zu erheben waren. Die Patienten zeigten jedoch bis auf SK und SU niedrigere mRNA-Expressionswerte für Cathepsin L als im „Normalknorpel“. Der Wert von Ausnahmepatient SU lag ~14-mal höher als der im „Normalknorpel“.

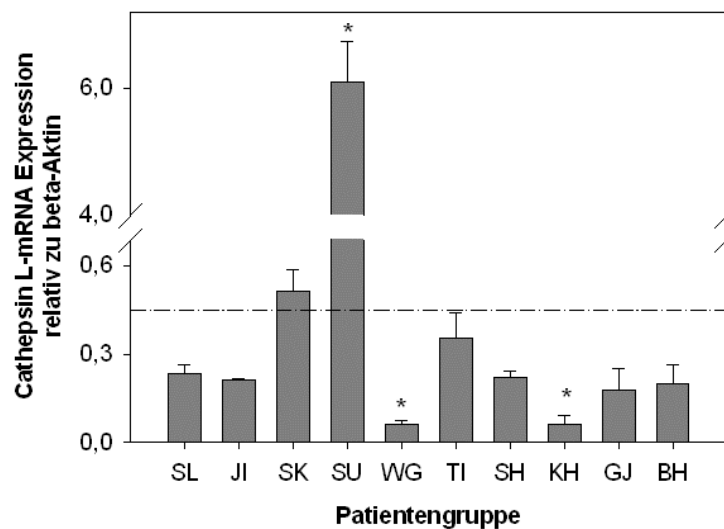


Abbildung 13: **Cathepsin L-mRNA Expression in humanen Chondrozyten.**

Die Chondrozyten wurden durch einen Verdau mit Kollagenase gewonnen. Nach einer Adhärenzphase von 24 h wurden die Zellen in Trizol aufgenommen und anschließend die RNA isoliert. Als Referenz diente die Cathepsin L-mRNA-Expression im „Normalknorpel BI (Strich-Punkt-Linie)“. Signifikante Unterschiede zwischen „Normalknorpel“ und OA-Knorpel sind mit \* gekennzeichnet (\*  $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3.5 Cystatin C

Cystatin C ist ein natürlicher extrazellulärer Inhibitor der Cathepsine. Erwartet wird bei erhöhter Cathepsinexpression auch eine erhöhte Expression des Gegenspielers, um ein Gleichgewicht zu gewährleisten und die Cathepsinwirkung in Grenzen zu halten. In Abbildung 14 ist zu sehen, dass die Cystatin-mRNA-Expression im „Normalknorpel“ im mittleren Bereich der Messwerte liegt. Signifikante Werte im Vergleich zum „Normalknorpel“ konnten bei WG, SH, KH ( $p < 0,01$ ) und SU ( $p < 0,001$ ) bestimmt werden.

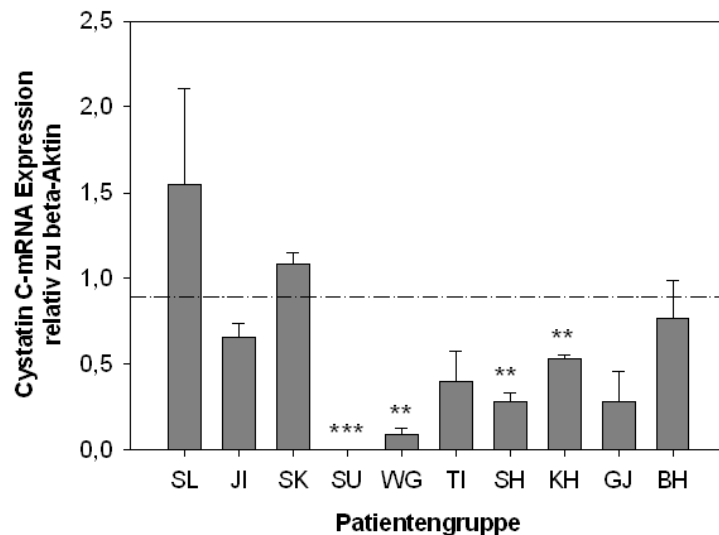


Abbildung 14: **Cystatin C-mRNA Expression in humanen Chondrozyten.**

Die Chondrozyten wurden durch einen Verdau mit Kollagenase gewonnen. Nach einer Adhärenzphase von 24 h wurden die Zellen in Trizol aufgenommen und anschließend die RNA isoliert. Als Referenz diente die Cystatin C-mRNA-Expression im „Normalknorpel BI (Strich-Punkt-Linie)“. Signifikante Unterschiede zwischen „Normalknorpel“ und OA-Knorpel sind mit \* gekennzeichnet (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).



#### 4.2.3.6 MMP 3

Abbildung 15 macht deutlich, dass die mRNA-Expression im „Normalknorpel“ für MMP 3 den dritthöchsten Wert erreicht. Bei SU, WG, SH, KH, GJ und BH ( $p < 0,05$ ) waren Werte mit signifikantem Unterschied zum „Normalknorpel“ zu erheben. Die Expressionswerte reichten vom 0,03-fachen der mRNA-Expression im „Normalknorpel“ bei KH bis zum 3,5-fachen bei SL.

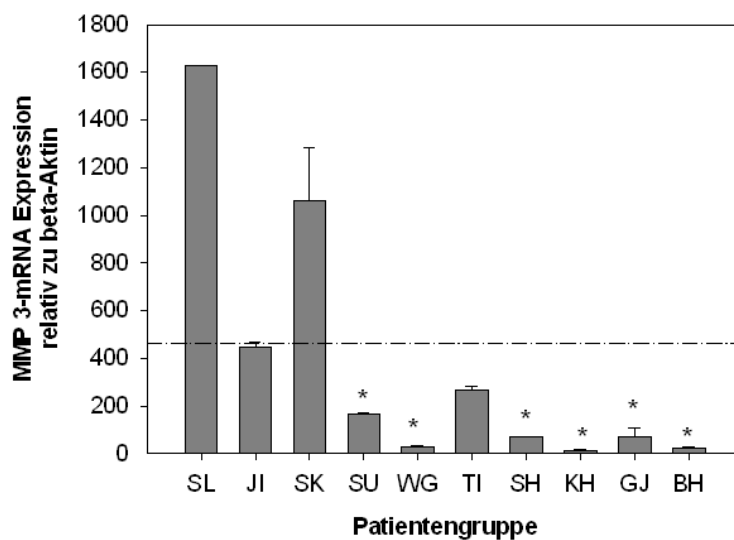


Abbildung 15: **MMP 3-mRNA Expression in humanen Chondrozyten.**

Die Chondrozyten wurden durch einen Verdau mit Kollagenase gewonnen. Nach einer Adhärenzphase von 24 h wurden die Zellen in Trizol aufgenommen und anschließend die RNA isoliert. Als Referenz diente die MMP 3-mRNA-Expression im „Normalknorpel BI (Strich-Punkt-Linie)“. Signifikante Unterschiede zwischen „Normalknorpel“ und OA-Knorpel sind mit \* gekennzeichnet (\*  $p < 0,05$ ).

#### 4.2.3.7 MMP 13

Die mRNA-Expression von MMP13 für den „Normalknorpel“ sollte gleich 0 sein, da gesundes Knorpelgewebe kein MMP 13 exprimiert, doch wie Abbildung 16 zeigt, lag der gemessene Wert im mittleren Bereich. Bei GJ ( $p<0,05$ ), JI, TI, SH ( $p<0,01$ ), KH und BH ( $p<0,05$ ) waren Werte mit signifikantem Unterschied zum „Normalknorpel“ zu erheben. Die Expressionswerte reichten vom 0,008-fachen der mRNA-Expression im „Normalknorpel“ bei WG bis zum ~20-fachen bei SU.

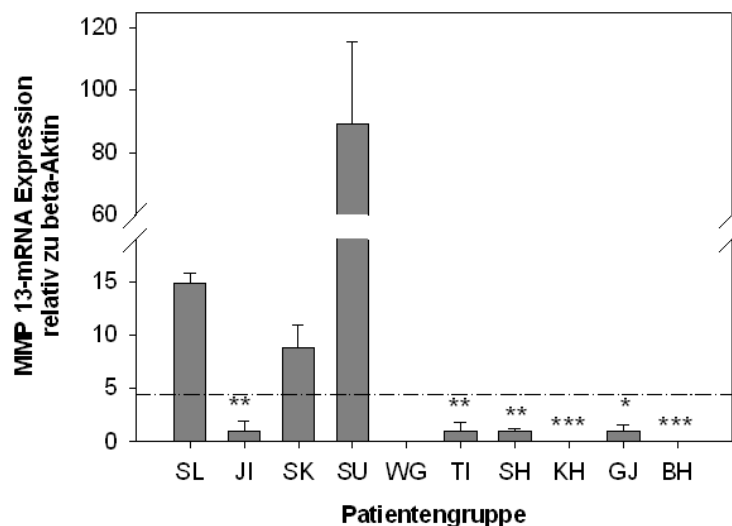


Abbildung 16: MMP 13-mRNA Expression in humanen Chondrozyten.

Die Chondrozyten wurden durch einen Verdau mit Kollagenase gewonnen. Nach einer Adhärenzphase von 24 h wurden die Zellen in Trizol aufgenommen und anschließend die RNA isoliert. Als Referenz diente die MMP 13-mRNA-Expression im „Normalknorpel BI (Strich-Punkt-Linie)“. Signifikante Unterschiede zwischen „Normalknorpel“ und OA-Knorpel sind mit \* gekennzeichnet (\*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ ).

#### 4.2.4 Kontrolle der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden zur Kontrolle auf ein Agarose-Gel gegeben und eine Gel-Elektrophorese wurde durchgeführt. Somit konnte einmal kontrolliert werden, ob überhaupt DNA im PCR-Produkt vorhanden war, und zum zweiten konnte überprüft werden, ob diese DNA dieselbe Größe wie das anvisierte Fragment hatte. Abbildung 17 fasst die Elektrophorese-Ergebnisse zusammen.

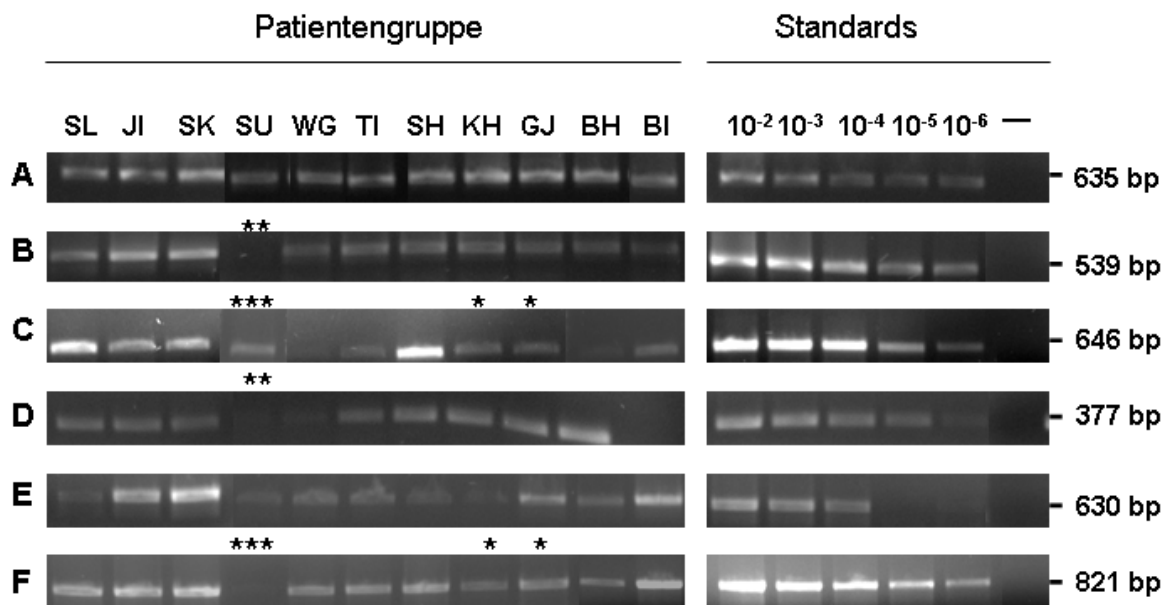


Abbildung 17: **Ausgewählte Kontrollgele der Real-Time PCR-Proben.**

Die mRNA-Expression von Cathepsin B (B), Cathepsin H (C), Cystatin C (D), MMP-3 (E) und MMP-13 (F) wurde mittels Real-Time PCR bestimmt (A entspricht  $\beta$ -Aktin). Die Abbildung zeigt die gelelektrophoretische Auswertung. Neben den Proben der Patienten wurden ebenfalls Die Standards sowie die Negativkontrolle (—) auf das Agarosegel aufgetragen. Die mit \* gekennzeichneten Banden enthalten verdünnte Proben (\* 1:10; \*\* 1:20; \*\*\* 1:40).

## 5 Diskussion

Es ist bisher nicht befriedigend gelungen, eine vollständige Erklärung für die Entstehung der Osteoarthritis zu finden. Jedoch wurden im Laufe der Zeit verschiedene Modelle entwickelt, die zur Klärung der Ursachen der Osteoarthritis beitragen. An erster Stelle sind die Theorien zu erwähnen, die sich mit biomechanischen Faktoren der Arthritisentstehung beschäftigten. Seit den 70er Jahren standen aber zunehmend im Gelenk ablaufende biochemische und zellbiologische Prozesse im Zentrum der Betrachtung. Diese widersprechen keinesfalls den klassischen Ansätzen, sondern ergänzen diese vielmehr. In den späten 70er Jahren kam es zu ersten Veröffentlichungen, die auf die Rolle proteolytischer Enzyme bei der Knorpeldegradation hinwiesen. Zum Beispiel beschrieb Birkedal-Hansen 1976 die Synthese und Sekretion einer Prokollagenase durch Synovialfibroblasten [117] und Sapolsky präsentierte im gleichen Jahr seine Ergebnisse über die proteoglykandegradierende Aktivität von Metalloproteinasen [118]. Seither wuchsen die Erkenntnisse über zellbiologische Vorgänge im Gelenk rasant. Diese Entwicklung hält bis heute an und führte zur momentan geltenden Vorstellung einer kartilaginären Homöostase. Diese versteht den Knorpel als ein vielschichtiges System mit anabolen und katabolen Prozessen, die, sofern sie im Gleichgewicht stehen, die Struktur und Funktion des Knorpels erhalten. Der vermehrte Abbau extrazellulärer Matrix bei der Arthritis ist als Resultat eines pathologischen Ungleichgewichts dieses Systems zugunsten kataboler Faktoren anzusehen. Die Erforschung dieser anabolen und katabolen Einflussgrößen mit ihrer Herkunft, Wirkung und Regulation steht seit 30 Jahren im Fokus der Arthroseforschung [119-124].

Die vorliegende Arbeit beschreibt die mRNA-Expression der Cathepsine B, H, K, L, des Cystatins C und der Matrixmetalloproteinasen 3 und 13 von humanen Chondrozyten bei Osteoarthritis. Von diesen Proteinasen ist bekannt, dass sie zur Degradation der extrazellulären Knorpelmatrix beitragen. Genetische Defekte wie die mit einem Mangel von Cathepsin K einhergehende Pyknodysostose [125] waren bei

keinem Patienten bekannt. Es konnte also von einer normalen Expression der Cathepsine ausgegangen werden.

Werden Proteasen freigesetzt, folgt biochemisch der Chondrozytenschädigung eine Zytokinsekretion. Ihre Konzentration ist im gesunden Gelenk niedrig, während sie im lädierten Gelenk ansteigt. Bei der Osteoarthritis sind insbesondere Interleukin-1, Interleukin-6 und der Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) hoch [126, 127]. Sie stimulieren unter anderem die Synthese von weiteren hydrolytischen Enzymen aus Chondrozyten und Synovialzellen. Zum Beispiel aktiviert Interleukin-1 die Fibroblasten zur Synthese von Kollagen Typ I und III. Eine Fibrosierung der Gelenkkapsel ist die Folge [128]. Andere Zytokine, wie Insulinabhängiger Growth Factor-1 und Transforming Growth Faktor- $\beta$ , stimulieren Proteoglycan- und Kollagensynthese [129, 130]. Unklar ist noch, welche der beiden Zellarten die Mehrzahl der Proteasen synthetisiert. Es wird aber angenommen, dass vorwiegend Chondrozyten Proteasen synthetisieren. Die Proteasenproduktion der Chondrozyten wird offenbar durch Zytokine und Leukotriene der Synovialzellen stimuliert [131].

Die Problematik der Arthritis wird aber nicht nur durch den Knorpelabbau bestimmt, sondern auch durch die Veränderungen der Synovialmembran in Form einer entzündlichen Reaktion. Diese ist Folge der degenerativen Prozesse im Knorpel und deshalb eine sekundäre Entzündung. Sie stellt häufig die erste klinische Manifestation der Arthritis dar [15] und beeinflusst mit ihrer Ausprägung und eigenen Prozessen den Arthroseverlauf entscheidend.

## **5.1 Methoden-Diskussion**

Bei der Gewinnung des Knorpelmaterials wurde darauf geachtet, dass nur Knorpelgewebe und kein Knochen bzw. Kallus geerntet wurde. Anhand angefertigter histologischer Präparate von Patientenproben, bei denen ausreichend Knorpel zu gewinnen war, konnte dies nachgewiesen werden. Die Präparate wurden nach dem MANKIN Score von zwei unabhängigen Personen beurteilt, um Objektivität und Aussagekraft zu gewährleisten. Bei allen histologischen Präparaten wurden Veränderungen im Sinne der Osteoarthritis festgestellt, jedoch schwankte der Grad

der Degeneration sehr stark zwischen den Patienten. Weiterhin stand Knorpelmaterial eines Amputationspatienten ohne klinische Beschwerden einer Gonarthrose zur Verfügung. Jedoch war bei diesem Patienten allein aufgrund des Alters (82 Jahre) zu erwarten, dass osteoarthrotische Veränderungen der Kniegelenke vorlagen. Bei der Knorpelgewinnung bestätigte sich dies deutlich. Der Knorpel an den Gelenkoberflächen war gelblich verfärbt als Zeichen degenerativer Prozesse und an den besonders beanspruchten Arealen niedriger als sonst. Obwohl nur makroskopisch gesund aussehender Knorpel geerntet wurde, ist die Formulierung als „Normalknorpel“ somit nicht ganz korrekt. Allerdings ist eine Gewinnung von vollkommen gesundem Knorpel kaum möglich, da Eingriffe an gesunden, klinisch symptomfreien Gelenken ethisch unvertretbar sind.

Während der Reversen Transkription, die der PCR vorgeschaltet ist, wurde die mRNA der ursprünglichen Probe in cDNA umgewandelt. Dieser Schritt ist sehr aufwendig und nur ungenau zu quantifizieren. Es war somit nur eine Aussage darüber möglich, wie viel cDNA in die PCR eingebracht wurde und nicht über die ursprünglich eingebrachte Menge an mRNA. Die Ergebnisse wurden jedoch alle relativ zu  $\beta$ -Aktin bestimmt, dessen mRNA auf gleiche Weise in cDNA umgewandelt wurde. Somit ist zu erwarten, dass sich Differenzen bei der Umwandlungsrate durch die Quotientenbildung wegekürzen.

Da schon geringste Verunreinigungen wie Proteine, Phenol, Chloroform, Salze, EDTA oder Heparin, die nicht vollständig während der Probenvorbereitung aus der Lösung entfernt wurden, bei der quantitativen Realtime-PCR zu falschen Ergebnissen führen würden, wurde zum einen sehr sauber und sorgfältig gearbeitet und zum anderen wurden Doppelbestimmungen und vor allem no-template Kontrollen vorgenommen. Bei starken Abweichungen der Doppelbestimmungen voneinander oder Anstieg der no-template Kontrolle, wurde die PCR gegebenenfalls wiederholt.

Zur Optimierung der quantitativen Aussagekraft wurde ein sogenanntes „Housekeeping“-Gen eingesetzt. Diese, als interner Standard gewählte VergleichsmRNA, unterliegt in seltenen Fällen aber ebenfalls metabolischen Schwankungen und ist somit nur bedingt als Kontrolle zu gebrauchen. Im Falle des gewählten  $\beta$ -

Aktin ist zum Beispiel bekannt, dass die Menge der mRNA in sich teilenden Zellen beträchtlich schwanken konnte [132-135].

## **5.2 Ergebnis-Diskussion**

Die Diskussion der Ergebnisse erfolgte zunächst ohne die Betrachtung der Expressionswerte von Patientin SU. Im Vergleich zum Normalknorpel zeigten 7 der 9 übrigen Gonarthrose-Patienten (außer KH und GJ) für Cathepsin B signifikant erhöhte mRNA-Expressionswerte, was die Untersuchungen von Bayliss MT und Ali SY [136] bestätigt. Für Cathepsin L zeigten nur WG und KH mRNA-Expressionswerte mit signifikantem Unterschied zum Normalknorpel. Sie waren jedoch niedriger als die Werte im Normalknorpel. Die mRNA-Expressionswerte der Cathepsine H und K lagen alle nahe denen im Normalknorpel, sodass bei keinem Patienten signifikant abweichende Werte zu verzeichnen waren.

Somit scheint vor allem Cathepsin B für den Knorpel-Katabolismus bei der Osteoarthrose verantwortlich zu sein. Es wird beschrieben, dass die intrazelluläre Cystein-Peptidase-Aktivität in Chondrozyten bei der Osteoarthrose vor allem Cathepsin B zuzuordnen ist [137]. Zum Beispiel sind Cathepsin L- und/oder Cathepsin K-Aktivitäten besonders subchondral vorzufinden, wohingegen Cathepsin B-Aktivität in Osteophyten, Zonen untergehenden Knorpels und Entzündungsbereichen nachgewiesen wurde [137].

Der 10. Patient (SU) hingegen zeigte für alle Cathepsine eine stark erhöhte mRNA-Expression verglichen mit Normalknorpel und  $\beta$ -Aktin.

Anhand von Studien war zu erwarten, dass verbunden mit einer erhöhten Cathepsin B-mRNA-Expression auch eine erhöhte Expression für Cystatin C-mRNA vorzufinden ist. Untergehendes Knorpel- und Knochengewebe, wie bei der Osteoarthrose und rheumatoiden Arthritis beobachtet, enthält aktivierte Fibroblasten und Makrophagen, die Cathepsin B und Cystatin C vermehrt exprimieren [138].

Lediglich für die Patientin SU lag die mRNA-Expression von Cystatin C im nicht messbaren Bereich und war somit signifikant niedriger als im Normalknorpel. Dieser Fall wird später detaillierter diskutiert.

Im Vergleich zum Normalknorpel erhöhte mRNA-Expressionswerte für Cystatin C waren bei dem jüngsten Patienten SL und bei Patient SK zu messen. Sie bestätigen die vorherige Annahme der Expressionssteigerung bei Osteoarthrose.

Die Matrix-Metalloproteasen (MMP) sind besonders bedeutsam, da sie viele Komponenten der extrazellulären Knorpelmatrix abbauen. In zahlreichen Studien können MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 13 und MT1-MMP im osteoarthrotisch veränderten Knorpel gefunden werden [139, 140]. Ihre Freisetzung korreliert nicht selten mit dem Schweregrad der Osteoarthrose. MMP-3 spielt dabei insofern eine besondere Rolle, weil es natives tripelhelikales Kollagen abbauen kann und Pro-MMP-1 aktiviert [141]. Beschrieben ist eine niedrige MMP-Expression in normalen Zellen [142]. Doch auch Patienten mit einer Osteoarthritis ohne Synovitis zeigen normale MMP-3-Level. Erhöhte MMP-3-Serum-Konzentrationen sind mit dem Vorhandensein einer Synovitis verbunden und reflektieren die inflammatorische Reaktion im Gelenk [143-145]. Die MMP-3-Serum-Konzentration korreliert auch mit der Zahl von befallenen Gelenken [143, 146-148] sowie mit der synovialen IL-6- und CRP-Konzentrationen. Das CRP wird abhängig vom zirkulierenden IL-6, TNF $\alpha$  und IL-1 von der Leber produziert und ist ein Marker der systemischen Inflammation, MMP-3 hingegen wird abhängig vom lokalen IL-6, TNF $\alpha$  und IL-1 im Gelenk produziert und ist ein Marker der synovialen Inflammation [143, 149, 150]. Desweiteren verursachen Kortikosteroide einen Anstieg der MMP-3-Serum-Konzentration. Der dazu führende Mechanismus ist bisher noch nicht geklärt.

Verglichen mit dem Normalknorpel hatten 8 der insgesamt 10 Patienten niedrigere mRNA-Expressionswerte für MMP 3 als der Normalknorpel. 6 Patienten zeigten sogar signifikant niedrigere Werte als der Normalknorpel. Lediglich der jüngste Patient SL und ein weiterer Patient (SK) hatten ein erhöhtes mRNA-Expressionsmuster verglichen mit dem Normalknorpel. Doch wie beschrieben war auch im Normalknorpel osteoarthrotische Aktivität anzunehmen. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass die Entzündungsreaktionen in den untersuchten Gelenken der Patienten so gering waren, dass es zu keinem Anstieg der MMP-3-



mRNA-Expression und letztendlich zu keiner erhöhten MMP-3-Serum-Konzentration kam.

MMP-13 hingegen hat ein auf wenige Gelenke eingeschränktes Expressionsmuster und wird nur von Knorpel und Knochen während der Entwicklung gebildet und von Chondrozyten bei Osteoarthritis [151-153]. Es zerstört Typ II-Kollagen [154].

Gegenüber dem Normalknorpel erhöhte MMP-13-mRNA-Expressionswerte waren jedoch nur bei drei Patienten (SL, SK, SU) nachweisbar, wobei SU den mit Abstand höchsten Wert zeigte. Doch da auch im Normalknorpel arthrotische Veränderungen nicht auszuschließen waren (Alter 83 Jahre), ist wahrscheinlich bei allen Patienten die Expression des Arthrosemarkers MMP 13 erhöht.

Im Anschluß an diese Untersuchungsreihe wurden die Enzymaktivitäten von Anke Rüttger bestimmt. Die Ergebnisse für Cathepsin H, K und L korrelierten positiv mit der mRNA- Expression und bestätigten das Ergebnis.

### **5.3 Diskussion der besonderen Ergebnisse von Patientin SU**

Aufgrund des starken Unterschiedes der mRNA-Expressionswerte von Patientin SU und den anderen Patienten, wurde diese Patientin von uns genauer betrachtet und untersucht. Die Erkenntnisse über diese Patientin wurden eingereicht zur Publikation in der „Zeitschrift für Orthopädie“ in der Rubrik Kasuistik unter dem Titel: Indikation zur Knie-Totalendoprothesenimplantation: Retropatellararthrose und Schmerz. Ein Fallbericht über eine stark erhöhte Expression der Cathepsine in Chondrozyten ohne besonders auffällige Knorpeldegradation. Die Patientin SU wurde im Alter von 69 Jahren aufgrund einer Gonarthrose rechts mit einer Knie-TEP versorgt. Das Körpergewicht betrug bei der Aufnahme 95 kg bei 172 cm Körpergröße, der BMI war 32,1. Eine mechanische Gelenkschädigung war röntgenologisch nicht zu verifizieren. Das präoperativ angefertigte Röntgenbild zeigte keine Fehlstellung der Gelenkachse, keine Gelenkspaltverschmälerung oder osteophytäre Veränderungen. Lediglich eine Retropatellararthrose sowie eine primäre Gonarthrose waren diagnostizierbar. Vorerkrankungen der Patientin waren eine Hüft-TEP links 1994, grauer Star rechts und links 2002, Thrombose und Lungenembolie 2003 sowie eine essentielle Hypertonie. Die Laborwerte: Hb 6,95 mmol/l, Hk 0,34, Erythrozyten 3,85 Tpt/l ließen

präoperativ auf eine leichte Anämie schließen. Postoperativ lagen diese Werte infolge intraoperativer Blutverluste etwas niedriger (Minimum: Hb 5,41mmol/l, Hk 0,26, Erythrozyten 3,0 Tpt/l), zeigten aber nachfolgend eine Tendenz zur Normalisierung. Nach der OP war weiterhin eine erhöhte Thrombozytenzahl (391Gpt/l) festzustellen, die Protein-Gesamtkonzentration war mit 56 g/l vermindert und das CRP lag zunächst bei 187,4 mg/l, später war es jedoch schon bei 23,7 mg/l. Leider wurde präoperativ kein CRP bestimmt, sonst hätte man den Grad der Begleitarthritis besser einschätzen können. Die OP-Indikation stellte sich bei dieser Patientin aufgrund konservativ nicht beherrschbarer Kniegelenksschmerzen. Es stellt sich somit die Frage, ob Cathepsine einen Einfluß auf das Schmerzempfinden haben. Man findet in der Literatur keine Hinweise darauf, dass die von mir untersuchten Cathepsine schmerzauslösende Peptide generieren können. Aus Hämoglobin kann Cathepsin D morphinomimetische Peptide generieren, sogenannte Hemorphine [155], dies hätte jedoch den gegenteiligen Effekt, also eher analgetische Wirkung. Eine mögliche schmerzverstärkende Wirkung könnte von PARs (protease aktivierbare Rezeptoren) ausgehen, die eine direkte Beziehung zu entzündungsbedingten Schmerzen besitzen [156]. Diese Rezeptoren werden zwar normalerweise von Cathepsin G, einer aus Granulozyten abgegebenen Serinprotease aktiviert, aber eine erhöhte Aktivität von Cysteinproteasen, vor allem wenn sie extrazellulär vorkommen, könnte u.U. auch zur Aktivierung solcher Rezeptoren führen. Ähnliches ist für die MMPs anzunehmen, die ja ohnehin extrazellulär vorkommen.

Im Zuge unserer Untersuchungen zur Expression ausgewählter Proteasen im Op.-Material von OA-Patienten stellten wir bei der quantitativen Realtime-PCR im Knorpelmaterial der Patientin SU für alle untersuchten Cathepsine erhöhte mRNA-Konzentrationen verglichen mit dem Normalknorpel fest. Außerdem war die mRNA des endogenen Cysteinprotease-Inhibitors Cystatin C nicht nachweisbar. Darüber hinaus war auch der mRNA-Expressionswert von MMP-13 massiv erhöht, hingegen lag der von MMP-3 unterhalb der Vergleichswerte im Normalknorpel.

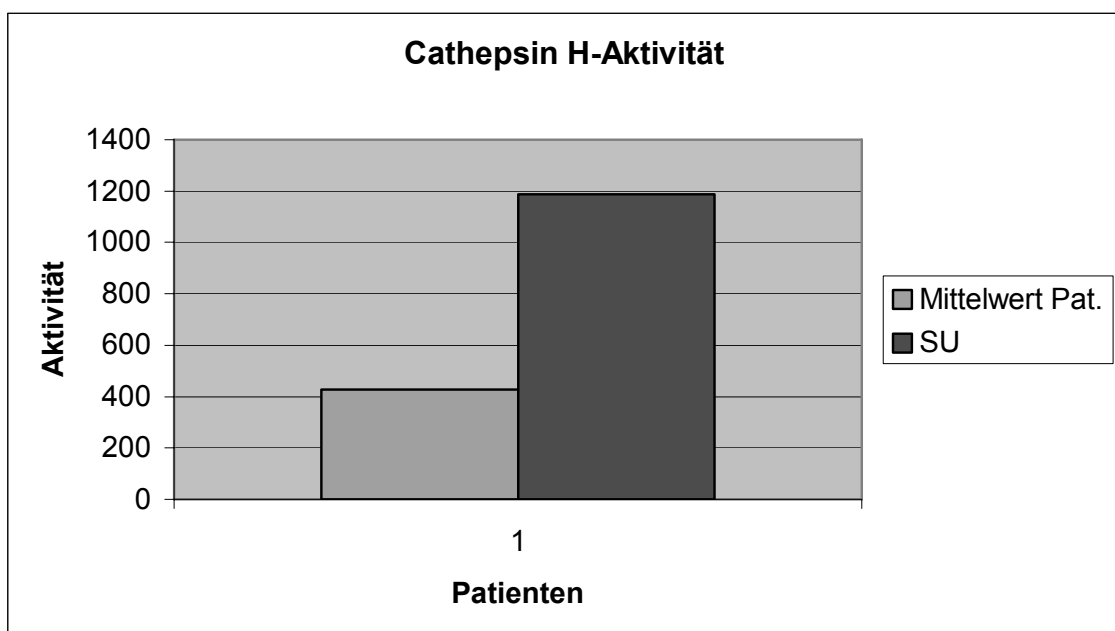
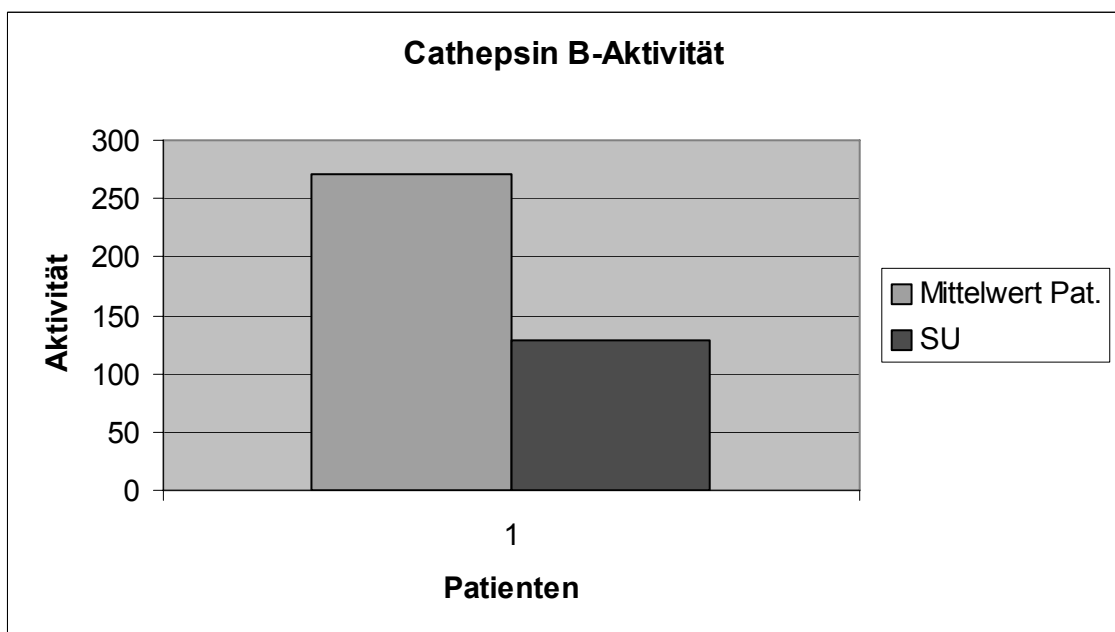
Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse wird ein Widerspruch deutlich. Insbesondere Cathepsin K wird seit einiger Zeit als ein sehr wichtiges Enzym für den Abbau des Typ II Kollagens angesehen [157]. Es entfaltet seine Wirkung gegenüber nativem Kollagen im Zusammenspiel mit Glycosaminoglykanen, wie sie in der

Knorpelgrundsubstanz vorkommen. Außerdem ist bereits seit langem bekannt, dass Cathepsin L kollagenolytische Aktivität aufweist, währenddessen die kollagenolytische Aktivität des Cathepsins B eher gegen nicht natives Kollagen gerichtet ist [31]. MMP-13 ist ebenfalls eine Kollagenase. Damit war im Knorpel der Patientin SU die mRNA Konzentration von mindestens drei Kollagen-abbauenden Proteasen erheblich höher als bei anderen Patienten und ein endogener Inhibitor war gar nicht vorhanden. Mithin wäre bei der Patientin SU eine massive Knorpeldestruktion zu erwarten gewesen, wenn die Hypothese korrekt ist, dass diese Proteasen eine wichtige Rolle beim Knorpelumbau spielen bzw. für die Destruktion des Knorpels bei den degenerativen und entzündlichen Gelenkerkrankungen spielen. Der Befund ist insofern von Bedeutung, als zahlreiche Pharmafirmen an der Entwicklung selektiver Hemmstoffe für diese Enzyme arbeiten, um bei den entsprechenden Erkrankungen das Fortschreiten der Knorpeldestruktion zu verzögern.

Die erhöhte mRNA-Expression der genannten Proteasen korrelierte jedoch nicht mit dem morphologischen Grad der röntgenologisch sichtbaren Destruktion der Kniegelenke. Die Patientin SU zeigte röntgenologisch weniger arthrotische Veränderungen als die übrigen Patienten, deren mRNA-Expressionswerte deutlich darunter lagen. Da eine Erhöhung der mRNA Konzentration nicht automatisch auch eine erhöhte Translationsrate beinhaltet, bestimmten wir als nächstes die Proteinkonzentration der Proteasen mittels Western Blot. Die Ergebnisse der PCR korrelierten mit den Ergebnissen des Western Blots. Des weiteren schloss sich eine selektive in vivo Aktivitätsbestimmung der einzelnen Cathepsine in Chondrozyten an, die wir aus dem Op.-Material der Patientin SU isoliert hatten [158]. Nach Rüttger et al. wurden dazu die Knorpelzellen aus dem gewonnenen Material zunächst isoliert und anschließend kultiviert [158]. Die adhärent wachsenden Zellen ( $10^5$  cells/well) wurden in 96-well-Platten ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation in DMEM/10% FCS wurde das Medium in serumfreies und Phenolrot-freies DMEM gewechselt, welches NSA (5-nitrosalicylaldehyde) in einer Konzentration von 10  $\mu$ M enthielt. Es folgte eine 2-stündige Inkubation der Zellen bei 37°C mit entsprechenden Substraten oder Inhibitoren. Nach diesen 2 Stunden wurden die Zellen mit 100  $\mu$ l PBS (phosphate-buffered saline) versetzt. Die Microtiter-Platten wurden mit dem Fluor-

S<sup>TM</sup> Multilmager aufgenommen und mit Hilfe der Quantity One<sup>®</sup> 4.2.1 Software qualifiziert (beides von Bio-Rad Laboratories, München). Die Emission des entstandenen Fluoreszenzproduktes war bei 488nm und 520-530nm Wellenlänge am stärksten. Bei allen Messungen wurden Doppelbestimmungen und Negativkontrollen durchgeführt.

Im direkten Vergleich der Cathepsinaktivitäten von Patientin SU und den anderen Patienten zeigten sich die in Abb. 18 aufgeführten Ergebnisse.



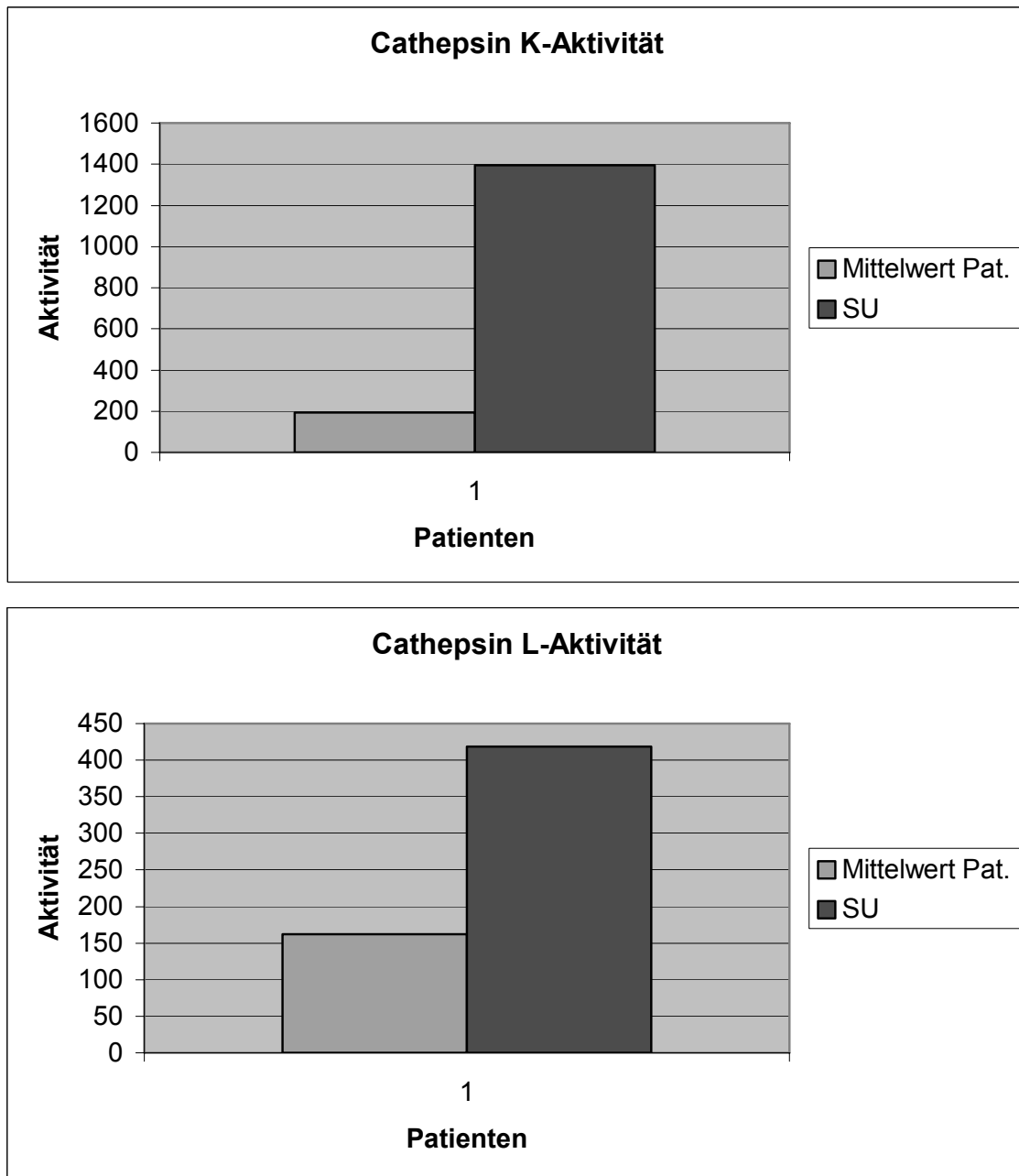


Abbildung 18: Cathepsin-Aktivitäten

Gegenüberstellung der gemittelten Aktivitäten für Cathepsin B, H, K, L der übrigen Patienten und der von Patientin SU.

Die durchschnittliche Aktivität von Cathepsin B war bei den anderen Patienten doppelt so hoch wie bei Patientin SU und steht somit im Widerspruch zu den gemessenen Expressionswerten für Cathepsin B. Für die übrigen Cathepsine (H, K und L) hingegen lagen die Aktivitätswerte von Patientin SU weit über denen der

übrigen Patienten. Die Aktivität von Cathepsin H war bei SU 2,8-fach höher, die von Cathepsin L 2,6-fach höher und die von Cathepsin K war sogar 7-fach höher als bei den anderen Patienten.

Um zu klären, ob es sich bei der erhöhten Expression der Proteasen bei der Patientin SU um ein lokales, auf die Chondrozyten begrenztes Phänomen oder um einen generellen Mechanismus handelte, bestimmten wir die mRNA-Expression der betreffenden Enzyme auch in peripheren Blutmonozyten. Dies ergab keinen von normalen gesunden Kontrollindividuen abweichenden Befund. Als Fazit aus den genannten Untersuchungen muss der wichtige Schluss gezogen werden, dass eine Erhöhung der Konzentration und der Aktivität matrixdegradierender Proteasen allein nicht ausreichend ist, um den destruktiven Prozess zu erklären, der sich im Gefolge entzündlicher Gelenkerkrankungen einstellt. Konsequenterweise erscheint demnach auch fragwürdig, als Therapieoption z.B. selektiv die Aktivität von Cathepsin K zu unterdrücken. Die Tatsache, dass erhöhte Cathepsin H, L und K sowie erhöhte MMP-13-Aktivitäten zusammen mit fehlendem Cystatin C bei der Patientin SU nicht zur vermehrten Knorpeldestruktion führten, stützt die Behauptung. Es bleibt allerdings offen, ob die Chondrozyten selbst für den Umbau der Matrix verantwortlich sind, oder ob andere Zellen der Gelenkinnenauskleidung, z.B. die Synoviozyten dies tun. Kollagenabbauprodukte sind elektronenoptisch in Fibroblasten aus arthritischen Gelenken nachgewiesen worden [159].

Allerdings lässt ein anderer Befund aus unserer Arbeitsgruppe ebenfalls an einer entscheidenden Rolle des Cathepsins K für die Knorpeldestruktion bei der rheumatoiden Arthritis zweifeln. Wir haben uns mit der Rolle des Cathepsins K bei der rheumatoiden Arthritis mit Hilfe von Cathepsin K<sup>-/-</sup>-Mäusen beschäftigt. Die Mäuse waren gleichzeitig transgen für TNF-alpha. Solche Mäuse entwickeln im 3. Monat spontan eine rheumatoide Polyarthrititis. Zu unserer Überraschung zeigte sich kaum ein Unterschied hinsichtlich Entzündung und Knorpeldestruktion in den Gelenken von TNF-alpha transgenen Cathepsin K<sup>-/-</sup> und WT-Mäusen [160]. Es muss also neben Cathepsin K andere Proteasen mit kollagenabbauender Aktivität geben, die den Verlust von Cathepsin K kompensieren. Wir konnten weiterhin zeigen, dass die Osteoklasten und die synovialen Fibroblasten genauso metabolisch aktiv waren und Proteasen sezernierten wie Chondrozyten. Eine Begrenzung des Effektes auf

einen bestimmten Zelltyp ist auf der Grundlage der Daten demnach nicht möglich. Obwohl stets bei der Übertragung experimenteller Aussagen vom Tier zum Menschen Zurückhaltung geboten ist, kann konstatiert werden, dass weder die Überexpression von Cathepsin K (und anderer Cathepsine) zu vermehrter, noch das komplette Fehlen dieses Enzyms zu verminderter Knorpeldestruktion geführt haben. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass wir die Kinetik der Prozesse nicht verfolgt haben, sondern dass sich bei der Analyse in beiden Fällen ein Momentbild darstellte. Mit welcher Geschwindigkeit sich im Falle des Tierversuches der Knorpelverlust entwickelt hat, wissen wir nicht, genauso wie wir nicht wissen, welcher Kompensationsmechanismus sich bei der Patientin SU eingestellt hat, um die Knorpeldestruktion trotz erhöhter Protease-Aktivitäten zu begrenzen. Auf jeden Fall ist zu erwarten, dass eine selektive pharmakologische Hemmung des Cathepsin K keine sehr aussichtsreiche therapeutische Option zur Vermeidung der Knorpeldestruktion bei OA und RA darstellt.

Die einzige untersuchte Protease, deren mRNA-Expression bei der Patientin SU nicht erhöht war, sondern im mittleren Bereich und unterhalb des Normalknorpels lag, war MMP-3. Wie schon beschrieben ist MMP-3 ein Marker für die Schwere der Entzündungsreaktion im Gelenk [161, 162]. Der niedrige MMP-3-Expressionswert bei SU spricht nun dafür, dass präoperativ nur eine mäßige Entzündungsreaktion im Gelenk vorlag.

Da die Werte nur für 11 Patienten bestimmt wurden, konnte nicht auf gewichts- und altersabhängige oder geschlechtsspezifische Unterschiede eingegangen werden. Darauf könnte im Rahmen einer größeren Studie in Zukunft Wert gelegt werden, ebenso wie auf einen Vergleich mit tierischen Studien oder die Cathepsinwirkung auf andere Gewebe.

Abschließend kann gesagt werden, dass Cathepsin B ein früher Marker für das Vorhandensein einer Osteoarthritis ist. Der Nachweis von Cathepsin B im Knorpel könnte eventuell eine frühe Diagnose der Osteoarthritis ermöglichen, noch bevor morphologische Veränderungen des Gewebes sichtbar sind. Dargestellt werden könnte Cathepsin B z.B. mittels NIR (near-infrared) fluorescence [163].

## 6 Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass 9 von 10 Gonarthrose-Patienten für die Cathepsine H, K und L keine signifikant erhöhten mRNA-Expressionswerte gegenüber dem Normalknorpel aufwiesen. Die Cathepsin B-mRNA-Expression war hingegen bei 7 dieser 9 Patienten signifikant erhöht, was auf eine entscheidende Beteiligung des Cathepsins B am Knorpel-Katabolismus schließen lässt. Auch die mRNA-Expressionswerte für Cystatin C sowie MMP 3 und 13 waren bei keinem der 9 Patienten signifikant höher als im Normalknorpel. Bei der anschließenden Aktivitätsbestimmung hat sich der Sachverhalt bestätigt. Somit reicht eine Erhöhung der Konzentration und Aktivität dieser Proteasen allein nicht, um die Knorpeldestruktion bei entzündlichen Gelenkerkrankungen zu erklären. Eine Patientin (SU) hingegen zeigte für alle Cathepsine signifikant erhöhte mRNA-Expressionswerte, der Wert für Cystatin C war signifikant erniedrigt (nicht messbar) und auch der Wert für MMP 13 war höher als bei den übrigen Patienten. Doch die gering ausgeprägte morphologisch fassbare Veränderung am Gelenkknorpel dieser Patientin unterstützt ebenfalls die Erkenntnis der fraglichen Beteiligung der untersuchten Enzyme am Abbau des Gelenkknorpels.



## 7 Literaturverzeichnis

1. Cooke, T.D., *Pathogenetic mechanisms in polyarticular osteoarthritis*. Clin Rheum Dis, 1985. **11**(2): p. 203-38.
2. Sulzbacher, I., *[Arthrosis--histology and pathogenetic approaches]*. Radiologe, 2000. **40**(12): p. 1126-33.
3. Sun, Y., et al., *[Incidence and prevalence of cox- and gonarthrosis in the general population]*. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 1997. **135**(3): p. 184-92.
4. Hoaglund, F.T. and L.S. Steinbach, *Primary osteoarthritis of the hip: etiology and epidemiology*. J Am Acad Orthop Surg, 2001. **9**(5): p. 320-7.
5. Remmele, W., ed. *Pathologie*. Vol. 5. 1997, Springer. 444-454.
6. Mohr, W., *[Morphological aspects of the pathogenesis of arthroses]*. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 1993. **131**(6): p. 477-82.
7. Aigner, T., et al., *Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA-array technology*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(12): p. 2777-89.
8. Bau, B., et al., *Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(10): p. 2648-57.
9. Felsen, D.T. and E.L. Radin, *What causes knee osteoarthritis: are different compartments susceptible to different risk factors?* J Rheumatol, 1994. **21**: p. 81-183.
10. Vingard, E., et al., *Occupation and osteoarthritis of the hip and knee: a register-based cohort study*. Int J Epidemiol, 1991. **20**(4): p. 1025-31.
11. Radin, E.L., et al., *Mechanical determinants of osteoarthritis*. Semin Arthritis Rheum, 1991. **21**(3 Suppl 2): p. 12-21.
12. Rhaney, K. and D.W. Lamb, *The cysts of osteoarthritis of the hip; a radiological and pathological study*. J Bone Joint Surg Br, 1955. **37-B**(4): p. 663-75.
13. Krenn, V., et al., *Molecular IgV(H) analysis demonstrates highly somatic mutated B cells in synovialitis of osteoarthritis: a degenerative disease is associated with a specific, not locally generated immune response*. Lab Invest, 1999. **79**(11): p. 1377-84.
14. Stiehl, P., *Histologie der Rheumatoid-Arthritis. Beitrag zur diagnostischen und pathogenetischen Heterogenität, zur Aktivitätsdiagnose und Prognose*. Clin Immunol, 1997. **5**: p. 188-200.
15. Fassbender, H.G., *Role of chondrocytes in the development of osteoarthritis*. Am J Med, 1987. **83**(5A): p. 17-24.
16. Goldenberg, D.L., M.S. Egan, and A.S. Cohen, *Inflammatory synovitis in degenerative joint disease*. J Rheumatol, 1982. **9**(2): p. 204-9.
17. Altman, R.D., *The classification of osteoarthritis*. J Rheumatol Suppl, 1995. **43**: p. 42-3.
18. Cooper, N.S., et al., *Diagnostic specificity of synovial lesions*. Hum Pathol, 1981. **12**(4): p. 314-28.
19. Kennedy, T.D., et al., *Morphometric comparison of synovium from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis*. J Clin Pathol, 1988. **41**(8): p. 847-52.
20. Revell, P.A., et al., *The synovial membrane in osteoarthritis: a histological study including the characterisation of the cellular infiltrate present in inflammatory osteoarthritis using monoclonal antibodies*. Ann Rheum Dis, 1988. **47**(4): p. 300-7.
21. Soren, A., N.S. Cooper, and T.R. Waugh, *The nature and designation of osteoarthritis determined by its histopathology*. Clin Exp Rheumatol, 1988. **6**(1): p. 41-6.
22. Polgar, L., *General aspects of proteases*. In *Mechanism of Protease Action*. CRC Press, 1989: p. 43-76.
23. Rawlings, N.D. and A.J. Barrett, *Families of cysteine peptidases*. Methods Enzymol, 1994. **244**: p. 461-86.
24. Berti, P.J. and A.C. Storer, *Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases*. J Mol Biol, 1995. **246**(2): p. 273-83.
25. Kirschke, H. and A.J. Barrett, *Chemistry of lysosomal proteases*. In *Lysosomes their Role in Protein Breakdown*. (Glaumann H, Ballard FJ, et al.) Acad Press, 1987: p. 193-238.
26. Willstätter, R. and E. Barmann, Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem, 1929. **180**: p. 127-43.
27. Riese, R.J., et al., *Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading*. Immunity, 1996. **4**(4): p. 357-66.
28. Tezuka, K., et al., *Molecular cloning of a possible cysteine proteinase predominantly expressed in osteoclasts*. J Biol Chem, 1994. **269**(2): p. 1106-9.

29. Krieger, T.J. and V.Y. Hook, *Purification and characterization of a novel thiol protease involved in processing the enkephalin precursor*. J Biol Chem, 1991. **266**(13): p. 8376-83.
30. Mason, R.W., et al., *Elastinolytic activity of human cathepsin L*. Biochem J, 1986. **233**(3): p. 925-7.
31. Delaisse, J.M., P. Ledent, and G. Vaes, *Collagenolytic cysteine proteinases of bone tissue. Cathepsin B, (pro)cathepsin L and a cathepsin L-like 70 kDa proteinase*. Biochem J, 1991. **279** ( Pt 1): p. 167-74.
32. Golde, T.E., et al., *Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives*. Science, 1992. **255**(5045): p. 728-30.
33. Mort, J.S., A.D. Recklies, and A.R. Poole, *Extracellular presence of the lysosomal proteinase cathepsin B in rheumatoid synovium and its activity at neutral pH*. Arthritis Rheum, 1984. **27**(5): p. 509-15.
34. Sloane, B.F., *Cathepsin B and cystatins: evidence for a role in cancer progression*. Semin Cancer Biol, 1990. **1**(2): p. 137-52.
35. Turk, D., et al., *Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases*. Biol Chem, 1998. **379**(2): p. 137-47.
36. Wilcox, D. and R.W. Mason, *Labelling of cysteine proteinases in purified lysosomes*. Biochem Soc Trans, 1989. **17**(6): p. 1080-1.
37. Fox, T., et al., *Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide*. Biochemistry, 1992. **31**(50): p. 12571-6.
38. Tao, K., et al., *The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit*. Arch Biochem Biophys, 1994. **311**(1): p. 19-27.
39. Mach, L., J.S. Mort, and J. Glossl, *Noncovalent complexes between the lysosomal proteinase cathepsin B and its propeptide account for stable, extracellular, high molecular mass forms of the enzyme*. J Biol Chem, 1994. **269**(17): p. 13036-40.
40. Kirschke, H., A.J. Barrett, and N.D. Rawlings, *Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases*. Protein Profile, 1995. **2**(14): p. 1581-643.
41. Kirschke, H., et al., *Cathepsin H: an endoaminopeptidase from rat liver lysosomes*. Acta Biol Med Ger, 1977. **36**(2): p. 185-99.
42. Chan, S.J., et al., *Nucleotide and predicted amino acid sequences of cloned human and mouse preprocathepsin B cDNAs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(20): p. 7721-5.
43. Shi, G.P., et al., *Molecular cloning and expression of human alveolar macrophage cathepsin S, an elastinolytic cysteine protease*. J Biol Chem, 1992. **267**(11): p. 7258-62.
44. Paris, A., et al., *Molecular cloning and sequence analysis of human preprocathepsin C*. FEBS Lett, 1995. **369**(2-3): p. 326-30.
45. Santamaria, I., et al., *Molecular cloning and structural and functional characterization of human cathepsin F, a new cysteine proteinase of the papain family with a long propeptide domain*. J Biol Chem, 1999. **274**(20): p. 13800-9.
46. Wang, B., et al., *Human cathepsin F. Molecular cloning, functional expression, tissue localization, and enzymatic characterization*. J Biol Chem, 1998. **273**(48): p. 32000-8.
47. Gal, S. and M.M. Gottesman, *Isolation and sequence of a cDNA for human pro-(cathepsin L)*. Biochem J, 1988. **253**(1): p. 303-6.
48. Joseph, L.J., et al., *Complete nucleotide and deduced amino acid sequences of human and murine preprocathepsin L. An abundant transcript induced by transformation of fibroblasts*. J Clin Invest, 1988. **81**(5): p. 1621-9.
49. Fuchs, R., W. Machleidt, and H.G. Gassen, *Molecular cloning and sequencing of a cDNA coding for mature human kidney cathepsin H*. Biol Chem Hoppe Seyler, 1988. **369**(6): p. 469-75.
50. Ritonja, A., et al., *Amino acid sequences of the human kidney cathepsins H and L*. FEBS Lett, 1988. **228**(2): p. 341-5.
51. Inaoka, T., et al., *Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K: novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **206**(1): p. 89-96.
52. Bromme, D., et al., *Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in Spodoptera frugiperda and characterization of the enzyme*. J Biol Chem, 1996. **271**(4): p. 2126-32.
53. Velasco, G., et al., *Human cathepsin O. Molecular cloning from a breast carcinoma, production of the active enzyme in Escherichia coli, and expression analysis in human tissues*. J Biol Chem, 1994. **269**(43): p. 27136-42.
54. Wiederanders, B., et al., *Phylogenetic conservation of cysteine proteinases. Cloning and expression of a cDNA coding for human cathepsin S*. J Biol Chem, 1992. **267**(19): p. 13708-13.

55. Santamaria, I., et al., *Cathepsin L2, a novel human cysteine proteinase produced by breast and colorectal carcinomas*. Cancer Res, 1998. **58**(8): p. 1624-30.
56. Linnevers, C., S.P. Smeekens, and D. Bromme, *Human cathepsin W, a putative cysteine protease predominantly expressed in CD8+ T-lymphocytes*. FEBS Lett, 1997. **405**(3): p. 253-9.
57. Santamaria, I., et al., *Cathepsin Z, a novel human cysteine proteinase with a short propeptide domain and a unique chromosomal location*. J Biol Chem, 1998. **273**(27): p. 16816-23.
58. Kirschke, H., et al., *Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins*. Biochem J, 1989. **264**(2): p. 467-73.
59. Karrer, K.M., S.L. Peiffer, and M.E. DiTomas, *Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(7): p. 3063-7.
60. Cygler, M. and J.S. Mort, *Proregion structure of members of the papain superfamily. Mode of inhibition of enzymatic activity*. Biochimie, 1997. **79**(11): p. 645-52.
61. Brocklehurst, K., et al., *Substrate-derived two-protonic-state electrophiles as sensitive kinetic specificity probes for cysteine proteinases. Activation of 2-pyridyl disulphides by hydrogen-bonding*. Biochem J, 1987. **244**(1): p. 173-81.
62. Bohley, P. and P.O. Seglen, *Proteases and proteolysis in the lysosome*. Experientia, 1992. **48**(2): p. 151-7.
63. Fruton, J.S., G.W. Irving, and M. Bergmann, J Biol Chem, 1941. **138**: p. 9374-81.
64. Baudys, M., et al., *S-S bridges of cathepsin B and H from bovine spleen: a basis for cathepsin B model building and possible functional implications for discrimination between exo- and endopeptidase activities among cathepsins B, H and L*. Biomed Biochim Acta, 1991. **50**(4-6): p. 569-77.
65. Guncar, G., et al., *Crystal structure of porcine cathepsin H determined at 2.1 Å resolution: location of the mini-chain C-terminal carboxyl group defines cathepsin H aminopeptidase function*. Structure, 1998. **6**(1): p. 51-61.
66. Barrett, A.J. and H. Kirschke, *Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L*. Methods Enzymol, 1981. **80 Pt C**: p. 535-61.
67. Drake, F.H., et al., *Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts*. J Biol Chem, 1996. **271**(21): p. 12511-6.
68. Bromme, D. and K. Okamoto, *Human cathepsin O2, a novel cysteine protease highly expressed in osteoclastomas and ovary molecular cloning, sequencing and tissue distribution*. Biol Chem Hoppe Seyler, 1995. **376**(6): p. 379-84.
69. Kafienah, W., et al., *Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix*. Biochem J, 1998. **331 ( Pt 3)**: p. 727-32.
70. Hou, W.S., et al., *Characterization of novel cathepsin K mutations in the pro and mature polypeptide regions causing pycnodysostosis*. J Clin Invest, 1999. **103**(5): p. 731-8.
71. Buhling, F., et al., *Expression of cathepsin K in lung epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **20**(4): p. 612-9.
72. Haackel, C., et al., *Expression of cathepsin K in the human embryo and fetus*. Dev Dyn, 1999. **216**(2): p. 89-95.
73. McQueney, M.S., et al., *Autocatalytic activation of human cathepsin K*. J Biol Chem, 1997. **272**(21): p. 13955-60.
74. Baron, R., *Molecular mechanisms of bone resorption by the osteoclast*. Anat Rec, 1989. **224**(2): p. 317-24.
75. Kirschke, H., et al., *Action of rat liver cathepsin L on collagen and other substrates*. Biochem J, 1982. **201**(2): p. 367-72.
76. Bohley, P., et al., eds. *Intracellular Proteolysis. In Biological Functions of Proteins (Holzer H, Tscheche H, et al.)*. 1979, Springer. 17-18.
77. Millest, A.J., et al., *Effects of an inhibitor of cathepsin L on bone resorption in thyroparathyroidectomized and ovariectomized rats*. Bone, 1997. **20**(5): p. 465-71.
78. Stebbins, J.W., et al., *Determination of a native proteolytic site in myelin-associated glycoprotein*. Biochemistry, 1997. **36**(8): p. 2221-6.
79. Yagel, S., et al., *Suppression by cathepsin L inhibitors of the invasion of amnion membranes by murine cancer cells*. Cancer Res, 1989. **49**(13): p. 3553-7.
80. Barrett, A.J., *The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors*. Biomed Biochim Acta, 1986. **45**(11-12): p. 1363-74.

81. Abrahamson, M., et al., *Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids.* J Biol Chem, 1986. **261**(24): p. 11282-9.
82. Turk, V. and W. Bode, *The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases.* FEBS Lett, 1991. **285**(2): p. 213-9.
83. Abrahamson, M., et al., *Modification of cystatin C activity by bacterial proteinases and neutrophil elastase in periodontitis.* Mol Pathol, 1997. **50**(6): p. 291-7.
84. Murray, G.I., *Matrix metalloproteinases: a multifunctional group of molecules.* J Pathol, 2001. **195**(2): p. 135-7.
85. Visse, R. and H. Nagase, *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry.* Circ Res, 2003. **92**(8): p. 827-39.
86. Nagase, H., A.J. Barrett, and J.F. Woessner, Jr., *Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases.* Matrix Suppl, 1992. **1**: p. 421-4.
87. Cawston, T., *Matrix metalloproteinases and TIMPs: properties and implications for the rheumatic diseases.* Mol Med Today, 1998. **4**(3): p. 130-7.
88. Khasigov, P.Z., et al., *Matrix metalloproteinases of normal human tissues.* Biochemistry (Mosc), 2001. **66**(2): p. 130-40.
89. Wu, J.J., et al., *Sites of stromelysin cleavage in collagen types II, IX, X, and XI of cartilage.* J Biol Chem, 1991. **266**(9): p. 5625-8.
90. Hirose, T., et al., *Structure-function relationship of human neutrophil collagenase: identification of regions responsible for substrate specificity and general proteinase activity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(7): p. 2569-73.
91. Okazaki, I., et al., *Molecular mechanism of the reversibility of hepatic fibrosis: with special reference to the role of matrix metalloproteinases.* J Gastroenterol Hepatol, 2000. **15 Suppl**: p. D26-32.
92. Bode, W., et al., *Structural properties of matrix metalloproteinases.* Cell Mol Life Sci, 1999. **55**(4): p. 639-52.
93. Woessner, J.F., Jr., *Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling.* Faseb J, 1991. **5**(8): p. 2145-54.
94. Borkakoti, N., *Structural studies of matrix metalloproteinases.* J Mol Med, 2000. **78**(5): p. 261-8.
95. Massova, I., et al., *Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification.* Faseb J, 1998. **12**(12): p. 1075-95.
96. Nagase, H. and J.F. Woessner, Jr., *Matrix metalloproteinases.* J Biol Chem, 1999. **274**(31): p. 21491-4.
97. Ortega, N., et al., *How proteases regulate bone morphogenesis.* Ann N Y Acad Sci, 2003. **995**: p. 109-16.
98. Masure, S., et al., *Mouse gelatinase B. cDNA cloning, regulation of expression and glycosylation in WEHI-3 macrophages and gene organisation.* Eur J Biochem, 1993. **218**(1): p. 129-41.
99. Reponen, P., et al., *Molecular cloning of murine 72-kDa type IV collagenase and its expression during mouse development.* J Biol Chem, 1992. **267**(11): p. 7856-62.
100. Apte, S.S., et al., *The matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) gene is structurally distinct from other MMP genes and is co-expressed with the TIMP-2 gene during mouse embryogenesis.* J Biol Chem, 1997. **272**(41): p. 25511-7.
101. Nagase, H., *Activation mechanisms of matrix metalloproteinases.* Biol Chem, 1997. **378**(3-4): p. 151-60.
102. Rodgers, W.H., et al., *Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones.* J Clin Invest, 1994. **94**(3): p. 946-53.
103. Shapiro, S.D., *Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences.* Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(5): p. 602-8.
104. Forget, M.A., R.R. Desrosiers, and R. Beliveau, *Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis.* Can J Physiol Pharmacol, 1999. **77**(7): p. 465-80.
105. Egeblad, M. and Z. Werb, *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(3): p. 161-74.
106. Milani, S., et al., *Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver.* Am J Pathol, 1994. **144**(3): p. 528-37.
107. Manicourt, D.H., et al., *Levels of circulating collagenase, stromelysin-1, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 in patients with rheumatoid arthritis. Relationship to serum levels of antigenic keratan sulfate and systemic parameters of inflammation.* Arthritis Rheum, 1995. **38**(8): p. 1031-9.
108. Stamenkovic, I., *Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases.* J Pathol, 2003. **200**(4): p. 448-64.

109. Kuettner, K.E., E.J. Thonar, and M.B. Aydelotte, *Modern aspects of articular cartilage biochemistry*. Verh Dtsch Ges Inn Med, 1989. **95**: p. 436-47.
110. Bustin, S.A. and R. Mueller, *Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis*. Clin Sci (Lond), 2005. **109**(4): p. 365-79.
111. Wilfingseder, D. and H. Stoiber, *Quantifizierung von PCR-Produktmengen durch realtime PCR-Verfahren*: Innsbruck.
112. Kiviranta, I., et al., *Microspectrophotometric quantitation of glycosaminoglycans in articular cartilage sections stained with Safranin O*. Histochemistry, 1985. **82**(3): p. 249-55.
113. Mankin, H.J., et al., *Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data*. J Bone Joint Surg Am, 1971. **53**(3): p. 523-37.
114. Chubinskaya, S., K.E. Kuettner, and A.A. Cole, *Expression of matrix metalloproteinases in normal and damaged articular cartilage from human knee and ankle joints*. Lab Invest, 1999. **79**(12): p. 1669-77.
115. Ocken, S.A.-M., *CD44-Expression bei experimentell induzierter Arthrose im Kaninchengelenk*. p. 29.
116. Collins, D.H. and E.T. Mc, *Sulphate (35SO<sub>4</sub>) uptake by chondrocytes in relation to histological changes in osteoarthritic human articular cartilage*. Ann Rheum Dis, 1960. **19**: p. 318-30.
117. Birkedal-Hansen, H., et al., *Synthesis and release of procollagenase by cultured fibroblasts*. J Biol Chem, 1976. **251**(10): p. 3162-8.
118. Sapolsky, A.I., et al., *Metalloproteases of human articular cartilage that digest cartilage proteoglycan at neutral and acid pH*. J Clin Invest, 1976. **58**(4): p. 1030-41.
119. Herman, J.H. and A.M. Appel, *Immunologic modulation of cartilage metabolism*. J Rheumatol, 1987. **14 Spec No**: p. 83-5.
120. Lotz, M., et al., *Cytokine regulation of chondrocyte functions*. J Rheumatol Suppl, 1995. **43**: p. 104-8.
121. Homandberg, G.A., *Potential regulation of cartilage metabolism in osteoarthritis by fibronectin fragments*. Front Biosci, 1999. **4**: p. D713-30.
122. Pujol, J.P., et al., *Effects of diacerein on biosynthesis activities of chondrocytes in culture*. Biorheology, 2000. **37**(1-2): p. 177-84.
123. Reddi, A.H., *Aging, osteoarthritis and transforming growth factor-beta signaling in cartilage*. Arthritis Res Ther, 2006. **8**(1): p. 101.
124. Aigner, T., S. Soeder, and J. Haag, *IL-1 beta and BMPs-interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration*. Eur Cell Mater, 2006. **12**: p. 49-56.
125. Li, C.Y., et al., *Mice lacking cathepsin K maintain bone remodeling but develop bone fragility despite high bone mass*. J Bone Miner Res, 2006. **21**(6): p. 865-75.
126. Yoshimatsu, T., et al., *Characterization of immortalized human chondrocytes originated from osteoarthritis cartilage*. Int J Mol Med, 2001. **8**(4): p. 345-51.
127. Shlopov, B.V., M.L. Gumanovskaya, and K.A. Hasty, *Autocrine regulation of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) during osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(1): p. 195-205.
128. Shiraishi, A., J. Dudler, and M. Lotz, *The role of IFN regulatory factor-1 in synovitis and nitric oxide production*. J Immunol, 1997. **159**(7): p. 3549-54.
129. Moldovan, F., et al., *Collagenase-3 (matrix metalloprotease 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: in vitro mimicking effect by transforming growth factor beta*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(9): p. 1653-61.
130. De Ceuninck, F., et al., *Pharmacological disruption of insulin-like growth factor 1 binding to IGF-binding proteins restores anabolic responses in human osteoarthritic chondrocytes*. Arthritis Res Ther, 2004. **6**(5): p. R393-403.
131. Lukoschek, M., et al., *[Synovial membrane and cartilage changes in an arthrosis model. Instability and impact stress model]*. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 1990. **128**(5): p. 437-41.
132. Schmittgen, T.D. and B.A. Zakrajsek, *Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR*. J Biochem Biophys Methods, 2000. **46**(1-2): p. 69-81.
133. Selvey, S., et al., *Beta-actin--an unsuitable internal control for RT-PCR*. Mol Cell Probes, 2001. **15**(5): p. 307-11.
134. Thellin, O., et al., *Housekeeping genes as internal standards: use and limits*. J Biotechnol, 1999. **75**(2-3): p. 291-5.
135. Zhong, H. and J.W. Simons, *Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **259**(3): p. 523-6.

136. Bayliss, M.T. and S.Y. Ali, *Studies on cathepsin B in human articular cartilage*. Biochem J, 1978. **171**(1): p. 149-54.
137. Lang, A., D. Horler, and A. Baici, *The relative importance of cysteine peptidases in osteoarthritis*. J Rheumatol, 2000. **27**(8): p. 1970-9.
138. Hansen, T., et al., *Cathepsin B and its endogenous inhibitor cystatin C in rheumatoid arthritis synovium*. J Rheumatol, 2000. **27**(4): p. 859-65.
139. Davidson, R.K., et al., *Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in synovium and cartilage*. Arthritis Res Ther, 2006. **8**(4): p. R124.
140. Soder, S., et al., *MMP-9/gelatinase B is a gene product of human adult articular chondrocytes and increased in osteoarthritic cartilage*. Clin Exp Rheumatol, 2006. **24**(3): p. 302-4.
141. Vincenti, M.P., et al., *Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase): mechanisms that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 1996. **6**(4): p. 391-411.
142. Vincenti, M.P. and C.E. Brinckerhoff, *Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors*. Arthritis Res, 2002. **4**(3): p. 157-64.
143. Taylor, D.J., N.T. Cheung, and P.T. Dawes, *Increased serum proMMP-3 in inflammatory arthritides: a potential indicator of synovial inflammatory monokine activity*. Ann Rheum Dis, 1994. **53**(11): p. 768-72.
144. Keyszer, G., et al., *Circulating levels of matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1), and MMP-1/TIMP-1 complex in rheumatic disease. Correlation with clinical activity of rheumatoid arthritis versus other surrogate markers*. J Rheumatol, 1999. **26**(2): p. 251-8.
145. Zucker, S., et al., *Elevated plasma stromelysin levels in arthritis*. J Rheumatol, 1994. **21**(12): p. 2329-33.
146. Sasaki, S., et al., *Detection of stromelysin in synovial fluid and serum from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis*. Clin Rheumatol, 1994. **13**(2): p. 228-33.
147. Yoshihara, Y., et al., *Increased levels of stromelysin-1 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in sera from patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1995. **38**(7): p. 969-75.
148. Ribbens, C., et al., *Matrix metalloproteinase-3 serum levels are correlated with disease activity and predict clinical response in rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 2000. **27**(4): p. 888-93.
149. Cheung, N.T., et al., *Yttrium-90 synovectomy decreases circulating pro-metalloproteinase-3 in recurrent synovitis*. Rheumatology in Europe, 1996. **25**: p. 35.
150. Ribbens, C., et al., *Synovial fluid matrix metalloproteinase-3 levels are increased in inflammatory arthritides whether erosive or not*. Rheumatology (Oxford), 2000. **39**(12): p. 1357-65.
151. Borden, P., et al., *Cytokine control of interstitial collagenase and collagenase-3 gene expression in human chondrocytes*. J Biol Chem, 1996. **271**(38): p. 23577-81.
152. Mengshol, J.A., et al., *Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(4): p. 801-11.
153. Vincenti, M.P., et al., *Cloning of the gene for interstitial collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) from rabbit synovial fibroblasts: differential expression with collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1)*. Biochem J, 1998. **331** ( Pt 1): p. 341-6.
154. Shlopov, B.V., et al., *Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(11): p. 2065-74.
155. Fruitier, I., I. Garreau, and J.M. Piot, *Cathepsin D is a good candidate for specific release of a stable hemorphin from hemoglobin in vivo: VV-hemorphin-7*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **246**: p. 719-24.
156. Cottrell, G.S., et al., *Protease-activated receptor 2: activation, signalling and function*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 6): p. 1191-7.
157. Li, Z., et al., *Regulation of collagenase activities of human cathepsins by glycosaminoglycans*. J Biol Chem, 2004. **279**(7): p. 5470-9.
158. Ruttger, A., et al., *Microplate assay for quantitative determination of cathepsin activities in viable cells using derivatives of 4-methoxy-beta-naphthylamide*. Biotechniques, 2006. **41**(4): p. 469-73.
159. Hou, W.S., et al., *Cathepsin k is a critical protease in synovial fibroblast-mediated collagen degradation*. Am J Pathol, 2001. **159**(6): p. 2167-77.
160. Saftig, P., et al., *Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13453-8.

161. Ribbens, C. and M. Malaise, [*Stromelysin-1 in inflammatory disease: significance, specificity, and regulation elements*]. Bull Mem Acad R Med Belg, 2001. **156**(5-6): p. 275-81; discussion 281-3.
162. Ribbens, C., et al., *Increased matrix metalloproteinase-3 serum levels in rheumatic diseases: relationship with synovitis and steroid treatment*. Ann Rheum Dis, 2002. **61**(2): p. 161-6.
163. Lai, W.F., et al., *Early diagnosis of osteoarthritis using cathepsin B sensitive near-infrared fluorescent probes*. Osteoarthritis Cartilage, 2004. **12**(3): p. 239-44.

## 8 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Charakteristika der in der Arbeit verwendeten Primer.
- Tabelle 2: Histologische Beurteilung nach MANKIN [112, 113].
- Tabelle 3: Zusammenfassende Auflistung relevanter Patientendaten.
- Tabelle 4: Bestimmung der RNA-Konzentration bzw. Ratio 260/280 des Patientengutes

## 9 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: PCR-Reaktion und C<sub>t</sub>-Wert-Bestimmung
- Abbildung 2: Schmelzkurvenanalyse
- Abbildung 3: Vergleich der Grading-Systeme nach COLLINS und MANKIN.
- Abbildung 4A: Knorpelgefrierschnitt von SL
- Abbildung 4B: Knorpelgefrierschnitt von SK
- Abbildung 4C: Knorpelgefrierschnitt von TM
- Abbildung 4D: Knorpelgefrierschnitt von BA

Abbildung 5: Ausgewählte radiologische Aufnahmen von Patienten mit Gonarthrose.

A: Radiologische Aufnahme von SH stehend, a.p.

B: Radiologische Aufnahme von GJ stehend, a.p.

C: Radiologische Aufnahme von GJ stehend, seitlich

Abbildung 6: Radiologische Aufnahmen von SU.

A: Radiologische Aufnahme von SU stehend, a.p.

B: Radiologische Aufnahme von SU sitzend, seitlich

Abbildung 7: Verlauf einer PCR-Reaktion in linearer Darstellung.

Abbildung 8: Standardgerade von MMP 3

Abbildung 9: Schmelzkurven der MMP-3 Real-time PCR

Abbildung 10: Cathepsin B-mRNA Expression in humanen Chondrozyten.

Abbildung 11: Cathepsin H-mRNA Expression in humanen Chondrozyten.

Abbildung 12: Cathepsin K-mRNA Expression in humanen Chondrozyten.

Abbildung 13: Cathepsin L-mRNA Expression in humanen Chondrozyten.

Abbildung 14: Cystatin C-mRNA Expression in humanen Chondrozyten.

Abbildung 15: MMP 3-mRNA Expression in humanen Chondrozyten.

Abbildung 16: MMP 13-mRNA Expression in humanen Chondrozyten.

Abbildung 17: Ausgewählte Kontrollgele der Real-Time PCR-Proben.

Abbildung 18: Cathepsin-Aktivitäten



## 10 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A <sub>260</sub> , A <sub>280</sub>	Absorption bei einer Wellenlänge von 260 bzw. 280 nm
Abb.	Abbildung
Ala	Alanin
a.p.	anterior-posterior
Asn	Asparagin
BMI	Body mass index
bp	base pairs (Basenpaare)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
cDNA	DNA-Kopie der RNA, komplementäre DNA
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease (chronisch obstruktive Lungenerkrankung)
CRP	C-reaktives Protein
C <sub>t</sub> -Wert	Threshold Cycle (Schwellenwert Zyklus)
Cys	Cystein
dF	delta Fluoreszenz
DIG/DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dT	delta Temperatur
E. Coli	Escherichia Coli

EGF	Epithelial Growth Factor
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
et al.	und Mitarbeiter
EthBr.	Ethidiumbromid
evtl.	eventuell
FKS	Fötales Kälberserum
FSU Jena	Friedrich-Schiller-Universität Jena
G	Guanin
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
H	hour(s), Stunde(n)
Hb	Hämoglobin
h Cathepsin	humanes Cathepsin
Hk	Hämatokrit
IL	Interleukin
k.A.	keine Angaben
kDa	Kilodalton
l	Liter
li.	links
m	männlich
m-	milli
M	molar
min	Minute(n)
MMP	Matrixmetalloproteinase(n)
mRNA	messenger Ribonucleic Acid

μ	Mikro-
μg	Mikrogramm
n-	nano-
N. fibularis	Nervus fibularis
NK	Normalknorpel
OA	Osteoarthrose
OP	Operation
OS	Oberschenkel
p.A.	pro Analyti
PARs	Protease aktivierbare Rezeptoren
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
Pro	Prolin
qRT PCR	quantitative Realtime-PCR
RA	Rheumatoide Arthritis
re.	rechts
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkription
sec	Sekunde(n)
Ser	Serin
syn.	Synonym für
T	Thymin

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEP	Totalendoprothese
Thr	Threonin
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u.U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett
w	weiblich
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach
z.T.	zum Teil

# 11 Lebenslauf

Name:	Müller
Vorname:	Christina
Geburtsdatum:	13.11.82
Geburtsort:	Jena
Familienstand:	ledig
Adresse:	Dorfstraße 45b, 07607 Gösen / Thüringen
Eltern:	Bernward Müller, MdB Sigrid Müller, Lehrerin
Geschwister:	Thomas Müller
Schulbildung:	Staatliche Grundschule Eisenberg West Friedrich-Schiller-Gymnasium, Eisenberg Abschluß: Abitur (LK: Mathematik, Biologie)
Universitärer Werdegang:	seit 2001 Friedrich-Schiller-Universität, Jena Studiengang: Humanmedizin seit 08/2006 Praktisches Jahr in Gera und Eisenberg

Christina Müller

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt:

**Prof. Dr. B. Wiederanders** für die Überlassung des Themas und gute Betreuung. Sein großes Interesse am Verlauf der Arbeit, seine wertvollen Hinweise und Ratschläge haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

**Prof. Dr. R.-A. Venbrocks** und dem Ärzteteam der Klinik für Orthopädie in Eisenberg für die gute Zusammenarbeit und Bereitstellung des Untersuchungsmaterials.

**Dr. J. Mollenhauer** für die anfängliche Betreuung und Unterstützung.

**Anke Rüttger** für ihre große Hilfsbereitschaft und freundschaftliche Zusammenarbeit. Von Anke wurden die Enzymaktivitäten untersucht und durch ihren und Fr. Dr. PD R. Fuhrmanns Einsatz gelang die Publikation in „Der Orthopäde“.

**Dr. Susann Schüler** für ihre fachliche Hilfestellung bei der Durchführung der quantitativen Realtime-PCR.

**Cordula Müller** für ihre Einweisung ins histologische Arbeiten und die Überlassung des Arbeitsplatzes in ihrem Labor.

dem gesamten Team des Forschungslabors am Waldkrankenhaus Rudolf Elleg GmbH Eisenberg und den Mitarbeitern des Institutes für Biochemie I am Klinikum der FSU Jena.

# Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Doktorarbeit ohne Hilfe Dritter und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben. Alle Stellen, die aus den Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht worden. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Gösen, den 5. April 2007

Christina Müller